



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario  
Tesis de Doctorado

“Generación de herramientas para el diseño  
racional de cultivos iniciadores: estudio  
comparativo de la regulación de vías  
metabólicas generadoras de aromas en  
bacterias lácticas”

Presentada por:  
**Gabriela Paula Martino**

**Rosario, Argentina**

**2018**

**“Generación de herramientas para el diseño racional de cultivos  
iniciadores: estudio comparativo de la regulación de vías metabólicas  
generadoras de aromas en bacterias lácticas”**

Gabriela Paula Martino, Licenciada en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el abril de 2013 y abril de 2018, bajo la dirección del Dr. Christian Magni y la Codirección del Dr. Víctor Blancato.

Director Dr. Christian Magni

Codirector Dr. Víctor Blancato

Jurado Dra. Gabriela Gago

Jurado Dra. Erica Hynes

Jurado Dra. María Pía Taranto

Defendida



## Agradecimientos

*“Era el atardecer. Al fondo de las calles, en el espacio entre las casas, apareció una luz confusa de arcoíris. La planta, después de aquel esfuerzo de crecimiento impetuoso que la había mantenido tensa hasta que terminara la lluvia, se encontró exhausta. Marcovaldo, continuando su carrera sin meta no se daba cuenta que detrás de él las hojas pasaban una a una del verde intenso al amarillo, un amarillo oro. Desde hacía un rato, sin que Marcovaldo se diera cuenta, un desfile de motos y autos y bicis y muchachos seguían el árbol que pasaba por la ciudad y gritaban:*

*– El baobab! El baobab! – y con grandes: – Oooh! – de admiración seguían el amarillear de las hojas. Cuando una hoja se desprendía y volaba lejos, muchas manos se levantaban para cogerla al vuelo.*

*Empezó a soplar viento; las hojas de oro, a ráfagas, corrían por el aire y planeaban. Marcovaldo todavía creía que a su espalda estaba el árbol verde y frondoso, hasta que de pronto -tal vez al sentir el viento golpearle sin obstáculos- volvió la cabeza. El árbol ya no estaba: solo un palo delgado del que salían numerosos pecíolos desnudos, y una última hoja amarilla lo coronaba. Junto a la luz del arcoíris todo lo demás parecía negro: la gente en las aceras, las fachadas de las casas alineadas en fila; y por encima de la negrura, en medio del aire, giraban y giraban cientos de hojas de oro, brillantes, y centenares de manos rojas y rosas se levantaban de la sombra para atraparlas; y el viento alzaba las hojas de oro hacia el arcoíris, allá al fondo, y las manos, y los gritos; y se desprendió también la última hoja que de amarilla se hizo naranja, luego roja violeta azul verde, luego otra vez amarilla y desapareció.”*

**de La lluvia y las hojas - Marcovaldo - Italo Calvino**

Agradezco a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, al Instituto de Biología Celular y Molecular de Rosario, a la ANPCYT y al CONICET, por aportar los medios necesarios para el desarrollo de este trabajo. Al laboratorio del Dr. Christian Magni por posibilitar su concreción.

**A mi familia, mi pareja y mis amigos, gracias por el cariño enorme que me demuestran constantemente. Solo por medio del amor suceden las grandes transformaciones. Gracias por el sostén y el empuje.**

Parte de los resultados presentados en la siguiente Tesis fueron presentados en las siguientes reuniones científicas y publicaciones.

## Congresos

- “Omics approach for safety and industrial potential assessment of food isolated enterococci” LII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular – Córdoba – Prov. de Córdoba – Argentina. Noviembre de 2016. Modalidad: poster.
- “Contribution of citrate metabolism to *Enterococcus faecalis* virulence” SIBAL – V Simposio Internacional de Bacterias Lácticas. Alimentos, Salud y Aplicaciones – San Miguel de Tucumán – Prov. de Tucumán – Argentina. Octubre de 2016. Modalidad: presentación oral y poster.
- “Genomic comparative analysis of four *Enterococcus faecium* strains isolated from cheese” SAIB – LI Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular – Mar del Plata – Prov. de Buenos Aires – Argentina. Noviembre de 2015. Modalidad: poster.
- “Lactic acid bacteria virulence assessment: in silico predictions vs *G. mellonella* in vivo assays.” SAIB – L Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular – Rosario – Prov. de Santa Fe – Argentina. Noviembre de 2014. Modalidad: poster.
- “Comparative genome analysis of lactic acid bacteria isolated from cheese” SAIB – L Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular – Rosario – Prov. de Santa Fe – Argentina. Noviembre de 2014. Modalidad: poster
- “Novel description of *Enterococcus faecium* citrate gene cluster” SAIB – L Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular – Rosario – Prov. de Santa Fe – Argentina. Noviembre de 2014. Modalidad: poster
- “Citrate metabolism in *Enterococcus faecium* reveals a high genetic diversity” SIBAL- IV Simposio Internacional de Bacterias Lácticas. Alimentos, Salud y Aplicaciones – San Miguel de Tucumán – Prov. de Tucumán – Argentina. Octubre de 2013. Modalidad: poster.
- “Virulence assesment of *Enterococcus* strains using *Galleria mellonella* as host model” SIBAL- IV Simposio Internacional de Bacterias Lácticas. Alimentos, Salud y Aplicaciones –

San Miguel de Tucumán – Prov. de Tucumán – Argentina. Octubre de 2013. Modalidad: presentación oral y poster.

- “New insights in the citrate fermentation of *Enterococcus faecium* IQ23 and its relationship with aroma production.” SAMIGE – IX Congreso Argentino de Microbiología general – Rosario – Prov. de Santa Fe – Argentina. Agosto de 2013. Modalidad: poster.

### Artículos de divulgación científica:

- “Aroma compounds generation in citrate metabolism of *Enterococcus faecium*: Genetic characterization of type I citrate gene cluster.” Martino GP, Quintana IM, Espariz M, Blancato VS, Magni C. Int J Food Microbiol. 2016 Feb 2;218:27-37. Epub 2015 Nov 14.
- “Draft Genome Sequences of Four *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Argentine Cheese.” Martino GP, Quintana IM, Espariz M, Blancato VS, Gallina Nizo G, Esteban L, Magni C. Genome Announc. 2016 Feb 4;4(1).
- “Safety assessment and functional properties of four enterococci strains isolated from regional Argentinean cheese”. Martino GP, Espariz M, Gallina Nizo G, Esteban L, Blancato VS, Magni C. Aceptado para su publicación en International Journal of food Microbiology (FOOD-D-17-00994R1).
- “Expression of the *Enterococcus faecalis* citrate fermentation genes during infection” Martino GP, Perez C, Magni C, Blancato VS. Enviado PlosOne.

# Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	1
<b>Lenguaje especial</b> .....	3
<b>Resumen</b> .....	4
<b>Introducción</b> .....	6
Las bacterias ácido lácticas y los alimentos .....	7
BAL en quesos y como probióticos.....	9
Metabolismo de citrato .....	10
Presencia de los genes <i>cit</i> en BAL .....	12
Grupo de genes <i>cit</i> de Tipo I .....	13
Grupos de genes <i>cit</i> de Tipo I .....	15
Generación de aroma en quesos.....	17
Producción de aroma a partir de citrato: vías de síntesis de compuestos de cuatro carbonos en BAL .....	18
Producción de aroma a partir de aminoácidos en BAL.....	20
El género <i>Enterococcus</i> .....	23
Filogenia de las especies incluidas en el género <i>Enterococcus</i> .....	24
Grupo <i>E. faecium</i> .....	25
Aplicaciones industriales .....	26
Enterococos como patógenos emergentes .....	28
<i>Galleria mellonella</i> como modelo de infección .....	30
Ciclo de vida y fisiología.....	31
Ventajas y validación del modelo .....	34
Curvas de Kaplan-Meier.....	35
<b>Objetivos</b> .....	38
Objetivo general .....	39
Objetivos específico .....	39
<b>Materiales y métodos</b> .....	40
Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos .....	41
Soluciones y medios de cultivos .....	43
Medios de cultivo .....	43
Soluciones inorgánicas.....	43
Crecimiento bacteriano .....	43
Condiciones de crecimiento .....	43
Puesta en competencia y transformación de cepas bacterianas .....	44
Manipulación de ADN.....	44
Extracción de ácidos nucleídos .....	44
Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	45
Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa .....	45
Digestión de ADN con enzimas de restricción .....	46
Desfosforilación de ADN plasmídico linealizado .....	46
Ligación de los fragmentos de ADN .....	46
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	46
Análisis de proteínas .....	46
Determinación de la concentración de proteínas .....	46
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida .....	47
Detección de proteínas en geles de poliacrilamida mediante ensayos de Western blot .....	47

Determinación de la producción de aroma .....	48
Pruebas de Voges-Proskauer .....	48
Ensayos específicos .....	49
Determinación de la producción de tiramina .....	49
Determinación de la actividad proteasa .....	49
Determinación de la actividad esterasa .....	49
Transporte de citrato radiactivo .....	50
Consumo de citrato por medidas de fluorescencia .....	50
Cuantificación de la formación de biofilm .....	51
Pruebas de susceptibilidad a antibióticos .....	51
Estimación del consumo de citrato por células en reposo por cromatografía en fase líquida de alto rendimiento (HPLC) .....	52
Determinación de consumo de azúcares.....	52
Recuento de UFC en sangre y orina.....	52
Lisis de glóbulos rojos .....	53
Ensayos en <i>Galleria mellonella</i> .....	53
Inoculaciones y ensayos de supervivencia .....	53
Recuentos de UFC in vivo .....	53
Extracción de hemolinfa y hemocitos.....	54
Microscopía de fluorescencia con hemolinfa .....	54
Análisis estadísticos.....	54
Métodos bioinformáticos.....	55
Obtención, ensamblado y anotación de datos genómicos.....	55
Análisis filogenómicos .....	55
Secuencias de inserción (IS), profagos, CRISPRs e islas genómicas (GEIs).....	56
Resistencias antibióticas, factores de virulencia y funciones metabólicas.....	56
<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>58</b>
<b>Resultados capítulo I .....</b>	<b>59</b>
Análisis de la expresión de los genes <i>cit</i> utilizando técnicas fluorescentes .....	60
Expresión de los genes <i>cit</i> durante el proceso de infección en <i>G. mellonella</i> .....	62
Importancia de la fermentación de citrato en la virulencia de <i>E. faecalis</i> JH2-2 en <i>G. mellonella</i> .....	64
Inducción del metabolismo de citrato de <i>E. faecalis</i> JH2-2 en fluidos de animales mamíferos.....	68
El metabolismo de citrato favorece la supervivencia de <i>E. faecalis</i> en hemolinfa, sangre y orina .....	70
<b>Discusión capítulo I .....</b>	<b>73</b>
<b>Conclusiones parciales.....</b>	<b>76</b>
<b>Resultados capítulo II .....</b>	<b>77</b>
Selección de cepas y descripción preliminar .....	80
Producción de compuestos de aroma: diacetilo y acetoina.....	88
Predicción de secuencias regulatorias .....	94
Descripción preliminar de las cepas de <i>E. faecium</i> Cit <sup>+</sup> de Tipo II .....	96
Análisis de los genes <i>cit</i> en el grupo <i>E. faecium</i> .....	101
<b>Discusión capítulo II .....</b>	<b>103</b>
<b>Conclusiones parciales.....</b>	<b>105</b>
<b>Resultados capítulo III .....</b>	<b>106</b>
Análisis filogenómico y asignación de especies.....	107
Propiedades de interés industrial.....	113
Azúcares.....	114
Proteínas, péptidos y aminoácidos.....	118
Actividades lipasa y esterasa .....	121
Metabolismo del citrato y piruvato .....	122



Tolerancia a sales biliares y bacteriocinas .....	122
Aminas biogénicas .....	123
Estabilidad genómica: secuencias de inserción, profagos, CRISPR, islas genómicas y plásmidos .....	125
Secuencias de inserción .....	126
Profagos .....	127
Locus CRISPR-Cas .....	128
Islas genómicas .....	128
Plásmidos .....	129
Resistencias a antibióticos .....	132
Evaluación de la virulencia .....	136
Sintenia genómica .....	140
<b>Discusión capítulo III .....</b>	<b>143</b>
<b>Conclusiones parciales .....</b>	<b>145</b>
<b>Conclusiones finales .....</b>	<b>147</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>152</b>

## Abreviaturas

2-HCT	transportador de 2-hidroxicarboxilatos
AB	aminas biogénicas
ABC	del inglés, casete de unión a ATP
AES	sistema experto del equipo Vitek 2
ALCDH	alcohol deshidrogenasa
ALD	a-acetolactato descarboxilasa
ALDH	aldehído deshidrogenasa
ALS	a-acetolactato sintetasa
ANI	del inglés, identidad nucleotídica promedio
AS	sustancia de agregación
BAL	bacterias ácido lácticas
BCECF	2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(γ-6)-carboxifluoresceína
BDH	butanodiol deshidrogenasa
BLC	bloques localizados colinealmente
BSH	del inglés, hidrolasa de sales biliares
C4	compuestos de cuatro carbonos
CBL	cistationina β-liasa
CC17	complejo clonal 17
CCR	del inglés, represión por catabolito
CDS	del inglés, secuencia de AND codificante
CGL	cistationina γ-liasa
CIM	concentración inhibitoria mínima
Cit <sup>-</sup>	genotipo bacteriano, incapaz de utilizar citrato
Cit <sup>+</sup>	genotipo bacteriano, capaz de utilizar citrato
CL	citrato liasa
Cre	del inglés, elemento de respuesta a catabolito
CRISPR	del inglés, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas
DAR	diacetilo acetoína oxidoreductasa
DMDS	dimetil disulfuro
DMTS	dimetil trisulfuro;
DO	densidad óptica
EDTA	N, N, N', N'-etilendiamino tetraacetato disódico
EFSA	del inglés, "European Food Safety Authority"
Em <sub>R</sub>	resistente a eritromicina
FA	fosfatasa alcalina
FAO	del inglés, "Food and Agriculture Organization of the United Nations"
FDA	del inglés, administración de drogas y alimentos
G+C	contenido de guaninas y citocinas
GEI	del inglés, islas genómicas
GFP	del inglés, proteína verde fluorescente
GluDC	glutamato deshidrogenasa

GRAS	del inglés, generalmente reconocido como seguro
HADH	hidroxiácido deshidrogenasa
HDD <i>is</i>	hibridación ADN-ADN in silico
HPLC	del inglés, Cromatografía líquida de alta resolución
IPS	solución fisiológica salina de insectos
IS	de inglés, secuencias de inserción
K-M	Kaplan- Meier
Kpi	solución tampón fosfato de potasio
LBC	medio LB suplementado con citrato
LBCG	medio LB suplementado con citrato y glucosa
LBCR	medio LB suplementado con citrato y ribosa
LBG	medio LB suplementado con glucosa
LBP	medio LB suplementado con piruvato
LBPG	medio LB suplementado con piruvato y glucosa
LBR	medio LB suplementado con ribosa
MGL	metionina $\gamma$ -liasa
MLSA	del inglés, análisis de secuencias multi locus
MLST	del inglés, tipificación multi locus de secuencias
n.d.	no detectado
nr/nt	base de datos de colección de nucleótidos
NSLAB	del inglés, bacterias lácticas no iniciadoras
OAD	oxaloacetato descarboxilasa
OPP	del inglés, permeasa de oligopéptidos
PBS	solución salina de fosfato
PDH	piruvato deshidrogenasa
PFL	piruvato formiato liasa
PT	fosfotransferasa
PTS	del inglés, sistema de fosfotransferasa
QPS	del inglés, calificado como presuntamente seguro
RC	del inglés “resting cells”
SLAB	del inglés, bacterias lácticas iniciadoras
SMM	el inglés, medio de leche descremada
SN	sobrenadantes
ST	del inglés, grupo secuencia tipo
TA	transaminasa
TAE	tris-acetato EDTA
TDC	tirosina descarboxilasa
UFC	unidad formadora de colonia
VP	Voges-Proskauer
WGS	del inglés, base de datos de genomas completos en cóntigos
WT	tipo salvaje
$\alpha$ -CADC	$\alpha$ -cetoácido descarboxilasa
$\alpha$ -CADH	$\alpha$ -cetoácido deshidrogenasa
$\mu_{\max}$	velocidad de crecimiento máxima

## Lenguaje especial

*In silico*: refiere a simulaciones realizadas virtualmente (con computadoras), por medio de las cuales se modelan procesos naturales o de laboratorio (de cualquier ciencia natural). La expresión está acuñada a partir de las frases del latín *in vivo* e *in vitro*, comúnmente usadas en biología.

*In vivo*: significa 'en el ser vivo'. Se emplea en referencia a los procedimientos de experimentación científica que se realizan con organismos vivos, en contraposición a los términos *in vitro* o *in silico*.

*Bootstrap*: técnica para estimar la exactitud de un árbol filogenético.

*Neighbor Joining (NJ)*: algoritmo utilizado en la construcción de arboles filogenéticos, donde el mejor árbol es aquel que minimiza la longitud de las ramas internas.

*Resting cells (RC)*: suspensión celular en solución inorgánica de elevada DO, donde se asume que el crecimiento celular está detenido.

*Enhancer*: En genética, un enhancer funciona como un potenciador o amplificador de la transcripción de un gen específico o un grupo de genes.

## Resumen

Los enterococos constituyen un grupo de microorganismos controversial dentro de las bacterias ácido lácticas (BAL). Por un lado, han adquirido importancia como patógenos oportunistas intrahospitalarios, por el otro, participan en la fermentación de alimentos aportando positivamente a sus propiedades organolépticas. Dentro de este género las especies más abundantes en las bases de datos son *E. faecalis* y *E. faecium*, ambos aislados comúnmente en hospitales. *E. faecalis* ha sido extensamente estudiado como patógeno, pero también en sus vías metabólicas que interesan a la industria alimenticia. En contraste, *E. faecium* se ha estudiado profundamente en los últimos años respecto de sus resistencias antibióticas y factores de virulencia, pero su contribución a los alimentos se encuentra escasamente desarrollada en la bibliografía.

La fermentación de citrato es clave en la producción de alimentos, especialmente en los quesos, como consecuencia de los compuestos de aroma que luego de este metabolismo se generan. Las rutas metabólicas implicadas en esta degradación, se han descripto ampliamente para *E. faecalis* ya que esta molécula orgánica se encuentra disponible en diversos nichos tales como la leche, la orina o la sangre humana y la mayoría de las cepas de esta especie son capaces de utilizarla.

A pesar de la amplia distribución de esta vía metabólica y de su relevante contribución al aroma y sabor de los quesos, en este trabajo demostramos que la presencia de los genes del metabolismo del citrato en la cepa *E. faecalis* JH2-2 contribuyen a su comportamiento patogénico en el animal modelo *G. mellonella*. De hecho, las cepas mutantes en esta ruta presentaron una capacidad reducida de infección. Al mismo tiempo, la cepa JH2-2 fue capaz de alcanzar un mayor recuento celular tanto en la hemolinfa del insecto como en sangre y orina. Todo ello indica que para *E. faecalis*, un metabolismo de citrato activo contribuye tanto a la supervivencia en el interior del insecto como al mejor crecimiento en los fluidos de mamíferos.

Para el caso de *E. faecium*, abordamos la relación entre la vía de fermentación de citrato y la de generación de compuestos de aroma y sabor. Determinamos que las cepas Cit<sup>+</sup> de Tipo I de *E. faecium* aisladas de queso presentaban un metabolismo de citrato activo, que conducía a una mejor producción de diacetilo y acetoína. Por el

contrario, la cepas genotípicamente Cit<sup>+</sup> de Tipo II, en las condiciones estudiadas no fueron capaces de evidenciar la fermentación de citrato<sup>-</sup>.

Al mismo tiempo, utilizando una combinación de herramientas *in silico* y ensayos *in vivo*, fuimos capaces de obtener una imagen integral de la diversidad genética que presentan las cepas del grupo *E. faecium* aisladas de quesos regionales. El análisis llevado a cabo nos permitió establecer un alto nivel de correlación entre los datos obtenidos *in vivo* e *in silico*, siempre y cuando se acompañen de la inspección manual detallada de las predicciones realizadas con los diferentes programas. Los resultados presentados muestran una estrategia ordenada para una posterior selección racional de microorganismos destinados a ser utilizados en la producción de alimentos fermentados, especialmente quesos. A su vez, las técnicas bioinformáticas utilizadas sumadas a pruebas fenotípicas clásicas nos permitieron descubrir la diversidad genotípica presente en las cepas del grupo *E. faecium*, lo que las hace únicas y poseedoras de gran potencial.

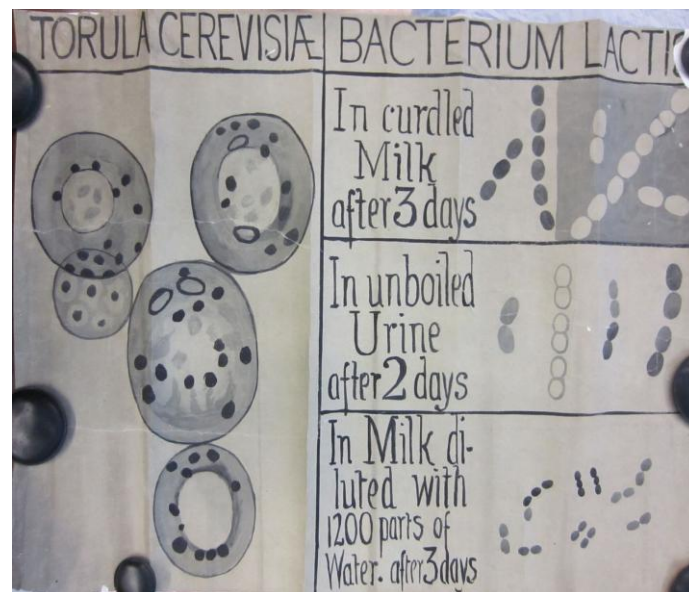
Lo expuesto en este trabajo señala la importancia de la ruta de degradación de citrato en la especie *E. faecalis* para el crecimiento, la persistencia o la colonización de diferentes nichos. Mientras que la diversidad encontrada en las cepas estudiadas de *E. faecium* indica una diferencia fundamental en la utilización de esta vía por parte de estos microorganismos.

Por último, la contribución al conocimiento sobre de la diversidad existente, la plasticidad genómica y las diferentes capacidades para causar enfermedades dentro del género *Enterococcus* es de vital importancia a la hora de seleccionar cepas particulares para usos específicos en alimentos.

## Introducción

## Las bacterias ácido lácticas y los alimentos

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo diverso de microorganismos que, como su nombre lo indica, tienen la capacidad común de convertir carbohidratos en ácido láctico. Fueron descubiertas por Louis Pasteur en 1857 y posteriormente aisladas a partir de leche rancia por Joseph Lister en 1878 (Fig. 1) (Ozen y Dinleyici, 2015). Desde ese momento, las BAL tuvieron un enorme éxito como cultivos destinados a la producción de alimentos fermentados. En las décadas siguientes, los estudios realizados sobre estos microorganismos establecieron las bases científicas que especificaron cómo y qué propiedades metabólicas de las BAL contribuían de manera significativa al sabor, el aroma, la textura, el valor nutricional y la seguridad microbiana de los derivados fermentados.



**Fig. 1.** Poster pintado a mano por la esposa de Lister, Agnes y/o su nieto Rickman Godlee, presentado en una clase inaugural en King's college de Londres, 1877. Tomado de (Richardson, 2013).

Tradicionalmente, han sido clasificadas en base a propiedades fenotípicas como la morfología, la fermentación de azúcares y otros compuestos, el crecimiento a diferentes temperaturas y el patrón de proteínas de la pared celular. Posteriormente, con el desarrollo de las técnicas moleculares se produjo una reorganización taxonómica de las BAL. Así, a partir de los estudios comparativos de las secuencias de los ARNr se redefinieron y crearon nuevos géneros y especies dentro del grupo (Makarova y Koonin, 2007; Makarova et al., 2006; Stiles y Holzapfel, 1997). Dichos análisis han permitido



incluir a estos microorganismos dentro de las eubacterias Gram positivas con bajo contenido de G+C, de la división *Clostridium-Bacillus*. Los principales géneros descriptos son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Bifidobacterium* y *Weissella*. Estos microorganismos son catalasa-negativos (con excepción del género *Aerococcus*), inmóviles, no esporulantes y anaerobios aerotolerantes.

Dentro de ellos se encuentran géneros que contienen especies patógenas de importancia médica (Krzyściak et al., 2013; Lebreton et al., 2013; Top et al., 2008), como así también géneros reconocidos como seguros para el consumo humano (denominados GRAS “Generally Recognised As Safe” según la FDA o QPS “Qualified Presumption of Safety según la EFSA) y que se utilizan históricamente en procesos fermentativos para la obtención de alimentos (Leroy y De Vuyst, 2004).

Los alimentos fermentados representan un tipo de productos que se obtienen a partir de la acción microbiana sobre una materia prima como la leche, las carnes o diferentes mostos. Los microorganismos actuantes pueden ser adicionados intencionalmente o bien presentarse naturalmente en ellos. La acción sobre el sustrato inicial puede otorgar características sensoriales y nutricionales positivas. Sin embargo, también pueden producirse efectos no deseados, los cuales conduzcan a la aparición de compuestos desagradables.

Los procesos artesanales suelen provocar fermentaciones espontáneas e incontroladas, lo cual genera productos de calidad irregular. Actualmente, se prefiere la inoculación de la materia prima con una pequeña cantidad de fermento proveniente de una fabricación anterior exitosa (Leroy y De Vuyst, 2004). A nivel industrial, en cambio, estas técnicas son sustituidas por la selección empírica y uso de cepas que favorezcan la aparición de ciertas cualidades en los productos. La mayoría de las bacterias implicadas en estos procesos pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Streptococcus* (Caplice y Fitzgerald, 1999; Cocolin et al., 2011; Leroy y De Vuyst, 2004; Settanni y Moschetti, 2010). Actualmente, mezclas cada vez más complejas son utilizadas con el objeto de generar cambios estacionales o particulares en la producción regional de alimentos tendiente a no aburrir a los consumidores ([www.chr-hansen.com](http://www.chr-hansen.com)).

## BAL en quesos y como probióticos

La elaboración de queso implica un proceso de deshidratación y concentración de los componentes de la leche. Las proteínas de la leche, denominadas caseínas, coagulan en las condiciones desnaturalizantes desarrolladas durante la manufactura, arrastrando consigo grasas, parte del agua y solutos. Ese coágulo formado recibe el nombre de cuajo, el cual luego, es sometido a diferentes tratamientos de acuerdo al tipo de queso que se desea obtener.

Sin importar el producto final pretendido, la fabricación de quesos a partir de leche requiere de la utilización de cultivos iniciadores o SLAB (del inglés “starter lactic acid bacteria”), naturales o seleccionados. Éstos son los responsables de iniciar la producción de ácido láctico, actividad de gran importancia en los quesos ya que junto con el calor, permiten la separación del cuajo y el suero. Al mismo tiempo, la generación de acidez es fundamental para impedir el crecimiento de bacterias patógenas o indeseadas para el proceso productivo (Cogan T.M., 1993).

Por otro lado, la maduración del queso se produce, principalmente, gracias a las bacterias denominadas no iniciadoras o NSLAB (por las siglas en inglés de “non starter lactic acid bacteria”). Éstas dominan la microbiota en las etapas de maduración debido a su capacidad para tolerar ambientes hostiles (bajos niveles de humedad, alta concentración de sales, bajos pH, bajas temperaturas, deficiencia de nutrientes; (Settanni y Moschetti, 2010).

En general las NSLAB contemplan a cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus*. Ambos tipos inciden de manera significativa en la calidad final de los quesos y sus propiedades organolépticas. Pueden estar presentes de manera natural como “microbiota adventicia” o bien ser adicionadas artificialmente, con fines varios como por ejemplo, la aceleración de las últimas etapas, la generación de sabores específicos o por sus propiedades probióticas. Nos referiremos a estas NSLAB adicionadas intencionalmente como a cultivos adjuntos (Giraffa, 2003).

Desde la antigüedad, diferentes culturas han usado los productos resultantes de fermentaciones en el tratamientos de diferentes afecciones (Ozen y Dinleyici, 2015; Sicard y Legras, 2011). No obstante, actualmente reconocemos en el término probiótico a aquellos microorganismos, originalmente presentes en los alimentos fermentados,

que puedan promover o favorecer el balance de la flora microbiana autóctona del tracto gastrointestinal (Franz et al., 2011; Holzapfel et al., 1998) y que, administrados en cantidades adecuadas, puedan conferir beneficios a la salud del hospedador, es decir, quien los consume (Joint FAO/WHO Working Group, 2002).

Los probióticos originalmente incluían a cepas de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* (Coeuret et al., 2004; Didari et al., 2014; Presti et al., 2015), mientras que actualmente se sugiere una mayor diversidad de cepas con propiedades potencialmente beneficiosas para la salud. Es así como hoy en día podemos encontrar cepas de *Enterococcus* con propiedades probióticas y otras que se comercializan con estos fines (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2012; Franz et al., 2011; Natarajan y Parani, 2015; Saavedra et al., 2003).

Para que una cepa determinada sea considerada probiótica debe cumplimentar con ciertos requisitos establecidos por los agentes reguladores de los diferentes estados. Por ejemplo, la Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) elaboró en 2001/2 una guía para la evaluación de probióticos en donde se establece que las cepas propuestas como probióticas deban ser previamente testeadas *in vitro* e *in vivo*, tanto en sus propiedades beneficiosas, como en su patogenicidad y su capacidad para transferir genes o resistir antibióticos (Joint FAO/WHO Expert Consultation, 2006; Joint FAO/WHO Working Group, 2002).

Entre las características principales de los probióticos podremos encontrar que: i) las cepas deben pertenecer a la microflora intestinal del hospedador, ii) deben tener efectos antagónicos frente a patógenos, iii) deben estimular el sistema inmune, iv) deben sobrevivir a los jugos gástricos y sales biliares, y v) deben adherir a la mucosa intestinal y colonizarla (Araújo y Ferreira, 2013).

## Metabolismo de citrato

El citrato es un compuesto que se encuentra ampliamente diseminado en el ambiente ya que está presente en las células de la mayoría de los seres vivos. Se lo encuentra tanto en la leche, en concentraciones de entre 9 y 10 mM (Garnsworthy et al., 2006), como en orina (0,5 a 3 mM) o en sangre humana (100  $\mu$ M aproximadamente) (Putnam, 1971; Walser, 1961).

Hoy en día, las rutas de degradación de citrato han sido bien establecidas en diversos géneros bacterianos, ya sean Gram negativos o Gram positivos. Los genes responsables de la degradación de este compuesto orgánico son denominados *cit* y las bacterias que los poseen Cit<sup>+</sup>.

En *Klebsiella pneumoniae*, el transporte y la utilización de citrato depende de dos operones: *citCDEFG* y *citS-oadGAB-citAB*. El primero es responsable de la ruptura inicial de la molécula de citrato por medio de la actividad citrato liasa. El segundo, contiene a los genes codificantes del transportador (*citS*), los de la oxaloacetato descarboxilasa (*oadGAB*) y los del sistema regulatorio de dos componentes (*citAB*; Bott et al., 1995). La presencia de la descarboxilasa habilita a *K. pneumoniae* a crecer con citrato como única fuente de carbono, en condiciones anóxicas y en ausencia de azúcares PTS, ya que se encuentra sujeto a represión por catabolito (Bott, 1997).

*Bacillus subtilis*, también posee un sistema de dos componentes, CitST, que reconoce citrato o isocitrato y activa la transcripción de *citM*. Este último codifica el transportador y su expresión se ve afectada por la presencia de fuentes de carbono preferenciales en el medio, tal como sucede en *K. pneumoniae* (Warner et al., 2003). Pese a ello, *B. subtilis* carece del complejo de la citrato liasa y la degradación de citrato ocurre vía ciclo de Krebs (Krom et al., 2003; Yamamoto et al., 2000).

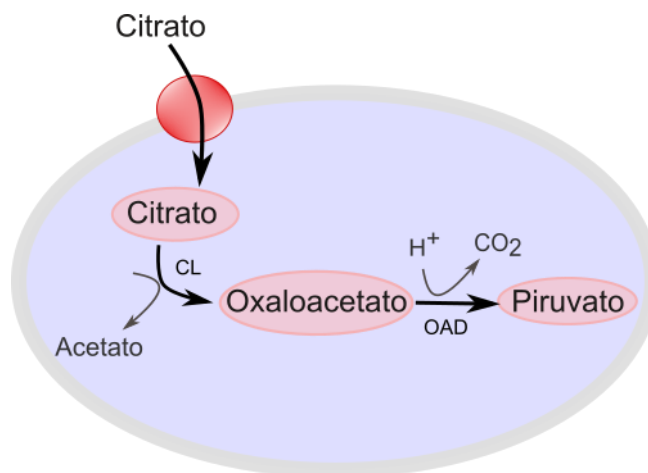
Para el caso de *Escherichia coli*, el grupo de genes *cit* incluye a los de la enzima citrato liasa así como al del transportador CitT, que realiza un antiporte con succinato (Pos et al., 1998). Esta bacteria carece de los genes codificantes de la oxaloacetato descarboxilasa, por lo que es incapaz de utilizar citrato como única fuente de carbono en medio mínimo (Lütgens y Gottschalk, 1980). La expresión de estos genes depende, nuevamente, de un sistema de dos componentes, CitAB, que a su vez, está en estrecha relación con la regulación de la respiración de fumarato (Scheu et al., 2012).

En el caso de las BAL, la ruta de utilización de citrato como fuente de carbono y energía ha sido extensamente estudiada (Blancato et al., 2008; De Vuyst et al., 2011; Díaz-Muñiz et al., 2006; Hugenholtz et al., 1993; Martín et al., 2004; Martin et al., 2005; Mortera et al., 2013; Vaningelgem et al., 2006), debido a que el citrato contribuye de manera significativa al crecimiento y a la resistencia a estrés en estos microorganismos (Cabral et al., 2007; Magni et al., 1999; Mortera et al., 2013; Sarantinopoulos et al., 2003; Vaningelgem et al., 2006). A su vez, la fermentación de citrato es clave en la

producción de alimentos fermentados, especialmente en los quesos, como consecuencia de los compuestos de aroma que luego de este metabolismo se generan.

En este grupo de bacterias, la ruta general implica la incorporación de citrato al interior celular, la rotura de la molécula y posterior descarboxilación de los productos (Fig. 2). El metabolismo se inicia con la ruptura catalizada por la enzima multimérica citrato liasa, que genera acetato y oxaloacetato. Luego, el oxaloacetato se descarboxila para formar piruvato y dióxido de carbono, por medio de la acción de oxaloacetato descarboxilasa. El resultado es la generación de un gradiente de pH (alcalino en el interior celular) como consecuencia del consumo escalar de protones durante la descarboxilación, lo cual contribuye a la fuerza protón motriz (Konings et al., 1997; Lolkema et al., 1995).

Lo anterior mencionado, no solo favorece el crecimiento de las bacterias que lo llevan a cabo, sino que la formación de dióxido de carbono durante la fermentación de leche es responsable de los ojos y la textura de ciertos quesos. La formación de piruvato es necesaria para la producción de compuestos de aroma como el diacetilo, que es esencial para la calidad de productos como la manteca o diferentes tipos de queso como el Cottage o Cheddar.



**Fig. 2. Ruta general de degradación fermentativa de citrato en BAL.** Se representa el transportador de citrato que lo incorpora al interior celular, para luego ser degradado en un primer paso por la enzima citrato liasa (CL), y en un segundo, por una oxaloacetato descarboxilasa (OAD) que genera piruvato como producto final.

### Presencia de los genes *cit* en BAL

Dentro de las BAL encontramos diferentes formas de la vía degradativa de citrato, las cuales están condicionadas por el tipo de genes *cit* que la bacteria posee y

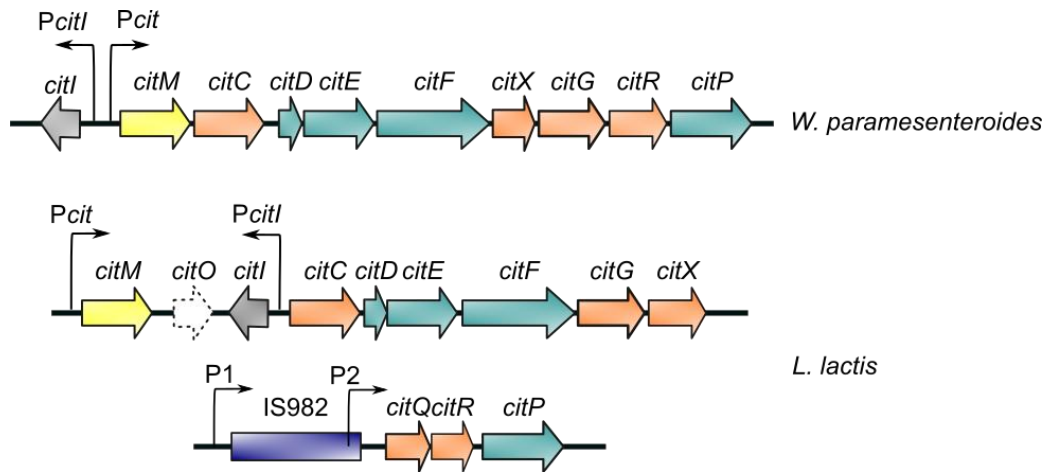
por las organizaciones de los mismos. Consecuentemente, podemos diferenciar a estos genes en dos grandes grupos, los cuales nos permitirán clasificar a las cepas Cit<sup>+</sup> en grupos Tipo I o Tipo II. Para ello tendremos en cuenta qué proteínas son codificadas dentro de los grupos de genes *cit*. Principalmente, pondremos atención en qué tipo de transportador, regulador transcripcional y descarboxilasas participan en cada vía.

### Grupo de genes *cit* de Tipo I

Esta versión del grupo de genes *cit* fue la primera en ser descrita en BAL (Bekal et al., 1998; de Felipe et al., 1995, 1996; García-Quintáns et al., 1998; Martín et al., 2000; Martín et al., 1999) y es definida como de Tipo I. Fue encontrada en especies de *Lactococcus lactis* (cepa CRL264) y *Weissella paramesenteroides* (cepa J1). La caracterización molecular de esta organización génica Tipo I se ha llevado a cabo en nuestro laboratorio de manera extensa. Las BAL que la poseen contienen a los genes codificantes de la oxaloacetato descarboxilasa citosólica, *citM*, los del complejo citrato liasa, *citCDEFG* y de la citrato permeasa (perteneciente a la familia de transportadores 2-HCT), *citP*.

El cuarto gen involucrado es el del regulador transcripcional CitI. Éste es un activador de los genes *cit*, que pertenece a la familia SorC/DeoR. La Fig. 3 muestra la organización completa de genes *cit* en *L. lactis* (CRL264) y *W. paramesenteroides* (J1).

Para el caso de *W. paramesenteroides* J1, los genes *cit* fueron localizados dentro del plásmido pCitJ1 (Martín et al., 2000; Martín et al., 1999). Estos genes incluyen al del regulador, *citI*, y a los contenidos en el operón *citM-citP*. Dos promotores divergentes, P*citI* y P*cit*, conducen la expresión del gen *citI* y del operón *citMCDEFXGRP* (Fig. 3), respectivamente. En la región intergénica definida entre los promotores, se han encontrado dos secuencias operadoras O1 y O2 a las cuales CitI es capaz de unirse cooperativamente. La unión de citrato a CitI permite aumentar la afinidad del complejo por las mismas. A su vez, CitI no solo favorece la transcripción a partir del promotor P*cit*, sino que estimula su propia expresión, amplificando en consecuencia la expresión del resto de los genes *cit*. De esta manera el citrato actuaría como inductor del sistema (Martín et al., 2000; Martín et al., 2005).



**Fig. 3. Genes del metabolismo de citrato de Tipo I en BAL.** Se muestran los grupos de genes *cit* para las cepas *W. paramesenteroides* J1 y *L. lactis* CRL264. Se indican los genes que codifican: el regulador transcripcional miembro de la familia DeoR, *citI*; la oxaloacetato descarboxilasa soluble, *citM*; la holoenzima citrato liasa, *citDEF*; las proteínas accesorias, *citG*, *citC*, *citX*, *citQ* y *citR*; el transportador de citrato, *citP*. *citO* corresponde un marco abierto de lectura que no se expresaría. *PcitI* y *Pcit* corresponden a los promotores del regulador y el operón degradativo, respectivamente. *P1* y *P2*, a los promotores a partir de los cuales se expresa el transportador de *L. lactis*. *IS982*, secuencia de inserción que modifica la expresión.

Por otro lado, nuestro equipo también ha profundizado los estudios sobre la organización génica en *L. lactis*. En la cepa CRL264, los genes responsables de la utilización de citrato se distribuyen entre una localización plasmídica y una cromosómica (Martín et al., 2004).

La región cromosomal incluye ocho genes: *citM*, *citI* y *citCDEFXG*. *citI* está orientado en oposición al resto de los genes (Fig. 3). A través de experimentos de Northern blot, en nuestro laboratorio se determinó que el grupo de genes *citM-CDEFXG* forman una unidad transcripcional, denominada operón *cit*, que se transcribe a partir del promotor *Pcit*, mientras que *citI* se transcribe a partir de un promotor diferente, *PcitI*.

La región dentro del plásmido pCit264 contiene al operón *citQRP*, a partir del cual se expresa la permeasa de citrato CitP. *citQ* sería un marco de lectura abierto putativo, mientras que CitR actuaría como un regulador negativo de la expresión de CitP. Los promotores *P1* y *P2* dirigen la transcripción a partir del operón plasmídico (Fig. 3; Martín et al., 2004).

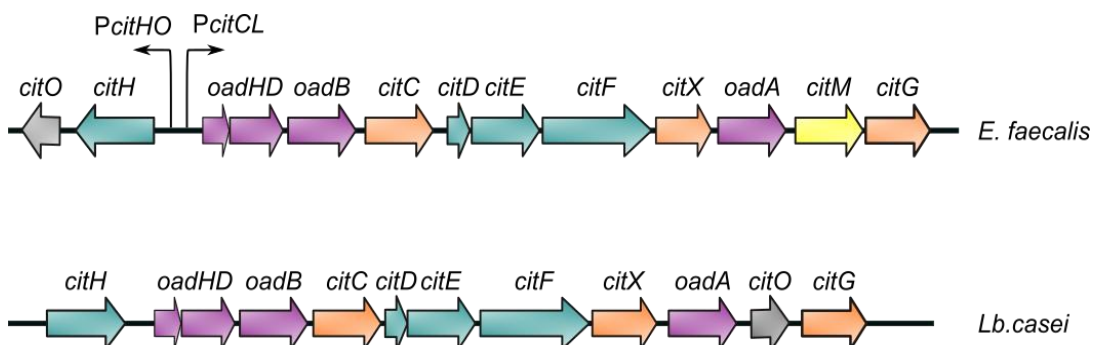
Ambos operones formados por los genes *cit* en *L. lactis* CRL264 se inducen a pH ácido y, a diferencia de *W. paramesenteroides*, no se ve influenciado de manera significativa por la presencia de citrato. Cuando las células de *L. lactis* detectan un

descenso en el pH externo, se induce la expresión de CitI. Esto da como resultado un aumento en la concentración del resto de las proteínas necesarias para el catabolismo de citrato. En esta cepa, la fermentación de citrato contribuye a la homeostasis de pH por medio de un consumo escalar de protones y una generación de especies menos ácidas, como el diacetilo o la acetoína (Martín et al., 2004).

### Grupos de genes *cit* de Tipo II

Esta organización tiene como representante a la especie *E. faecalis*, aunque también se ha descrito en algunas de *Lactobacillus* (Fig. 4). Se caracteriza por contener a los genes codificantes de la oxaloacetato descarboxilasa OAD de membrana, del complejo de la citrato liasa, de la citrato permeasa (perteneciente a la familia de CitMHS) y del regulador transcripcional CitO (que pertenece a la familia GntR).

En la cepa *E. faecalis* JH2-2, por medio ensayos de Northern blot, nuestro grupo de trabajo ha detectado dos unidades transcripcionales independientes, *citHO* y *oadHDB-citCDEFX-oadA-citMG* (Fig. 4). La primera constituye un operón que permitirá la expresión del regulador y el transportador de citrato CitH. La segunda codifica las enzimas degradativas, es decir, la citrato liasa (*citDEF*) y la oxaloacetato descarboxilasa OAD (*oadHDB-oadA*). *E. faecalis*, posee también otro tipo de descarboxilasa producto del gen *citM*, de tipo citosólica. Por medio de ensayos de protección de DNasal, nuestro grupo fue capaz de identificar dos promotores, *PcitHO* y *PcitCL*, activados por el regulador CitO (Blancato et al., 2008).



**Fig. 4. Organización génica Tipo II en BAL.** Se muestran los genes *cit* para las especies *E. faecalis* y *Lactobacillus casei*. Se muestran los genes que codifican: el regulador transcripcional miembro de la familia GntR, *citO*; la oxaloacetato descarboxilasa soluble, *citM*; la oxaloacetato descarboxilasa de membrana OAD, *oadA* y *oadHDB*; la holoenzima citrato liasa, *citDEF*; las proteínas accesorias, *citG*, *citC*, *citX*; el transportador de citrato, *citH*. *PcitHO* y *PcitCL* los promotores del regulador y el transportador y el operón degradativo de *E. faecalis*, respectivamente.



En esta bacteria el mecanismo molecular de activación transcripcional fue esclarecido. En presencia de citrato, CitO es capaz de unirse a las secuencias *cis* localizadas corriente arriba del promotor *PcitCL*, induciendo de este modo la expresión de los genes. Estas regiones son los operadores denominados O1 y O2 (Blancato et al., 2008).

Ensayos de calorimetría de titulación isotérmica, demostraron que CitO posee una alta afinidad por la molécula de citrato y no por otros ácidos orgánicos comunes. A su vez, el citrato estaría unido a un catión metálico (Blancato et al., 2016). Pese a ello, CitO sería capaz de unirse al sitio operador O1 aún en ausencia de citrato. Luego, la unión del catabolito al regulador aumentará su afinidad por la región O1, lo que permitirá posteriormente la unión a O2. De este modo, el citrato actúa como inductor del sistema y la expresión completa de la vía degradativa se daría cuando los niveles de CitO y citrato alcanzaran el umbral necesario para la unión al operador O2.

Al mismo tiempo, en nuestro laboratorio se pudo demostrar que este metabolismo estaba sujeto a una represión por catabolito, mediante mecanismos dependientes e independientes de la proteína CcpA (Suárez et al., 2011a). El mecanismo dependiente de CcpA requiere de esta proteína, de la proteína HPr y depende de las fuentes de carbono disponibles para la célula. En presencia de azúcares PTS, se gatilla la fosforilación de la proteína HPr en su serina 46. De este modo, P-Ser-HPr puede interactuar con el factor transcripcional global CcpA (Deutscher et al., 2006). De este modo el regulador es capaz de unirse a elementos *cis* del ADN, denominados sitios Cre (del inglés “catabolite responsive elements”), y como consecuencia reprimir la expresión de diferentes genes (Schumacher et al., 2004) que permitan la utilización de fuentes de carbono menos eficientes. En condiciones de crecimiento en donde la concentración de ATP es baja, la quinasa de HPr actúa como desfosforilasa reduciendo la cantidad del complejo CcpA-P-Ser-HPr y liberando la represión (Deutscher et al., 2006). De este modo, las bacterias pueden regular su preferencia de fuentes de carbono de acuerdo a la disponibilidad de las mismas y su estado metabólico.

Los azúcares que ingresan a la célula de *E. faecalis* por medio de un sistema de fosfotransferasa, como la glucosa, impiden la expresión a partir de los dos operones del catabolismo de citrato. En la región intergénica *citH-oadH*, se encontraron tres sitios regulatorios Cre, denominados *cre1*, *cre2* y *cre3*. Éstos permitirán unir al complejo

CcpA/P-Ser-HPr, lo cual impediría la expresión de los genes *cit* en presencia de un azúcar PTS. *cre1* y *cre2* contribuyen a la represión de *citHO* mientras que *cre3* está involucrado en la del operón *citCL* (Suárez et al., 2011a).

Para el caso de *Lactobacillus casei* ATCC 334, el metabolismo de citrato depende también del grupo de genes Tipo II. La incorporación de citrato es catalizada por el transportador CitH el cual pertenece a la familia de CitMHS donde el citrato es transportado junto al ión metálico  $\text{Ca}^{2+}$  (Mortera et al., 2013). El gen codificante para este transportador, junto al de regulador transcripcional y los de los complejos de la enzima citrato liasa y la oxaloacetato descarboxilasa de membrana formarían un operon (*citH-oadHDB-citCDEFX-oadA-citOG*), el cual es necesario para la degradación del citrato (Fig. 4). En *Lb. casei* ATCC 334 se demostró que esta ruta se induce en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y citrato durante el crecimiento y es reprimida por la acción de glucosa y galactosa. El metabolismo de citrato en esta bacteria es beneficioso para las células cuando éstas deben contrarrestar la acidificación producida por el metabolismo de azúcares en etapas tardías del crecimiento (Mortera et al., 2013).

## Generación de aroma en quesos

De acuerdo a los resultados obtenidos por Yvon y Rijnen (2001), la mitad de los compuestos de aroma y sabor producidos en los quesos provienen de la fermentación de citrato y lactosa, y en menor proporción de la lipólisis de grasas, mientras que la otra mitad deriva de la degradación de leucina y metionina (Tabla 1).

La percepción del sabor y el aroma de un alimento son procesos complejos que involucran muchos sentidos, no solo el olfato o el gusto, sino que también el tacto y la vista. La boca es capaz de reconocer cinco sabores básicos, esto es, salado, dulce, amargo, ácido y umami. El olfato posee mayor cantidad de receptores, lo cual le permite detectar una inmensa variedad de compuestos volátiles (Smith, 2012). Así es como, a la hora de saborear un producto fermentado, la conjunción de los diferentes compuestos químicos producidos, sumados a la apariencia y a la textura, determinarán que el alimento sea rico o no.

Podemos encontrar compuestos químicos que son clave para el sabor, mientras que otros son tan solo secundarios. Conocer estos compuestos y cómo afectan al

producto final no basta para obtener el alimento deseado. Es necesario conocer el rol de las actividades enzimáticas y no enzimáticas que conducen a su formación, así como las bacterias y las condiciones que la permiten (Smit et al., 2005).

**Tabla 1.** Compuestos orgánicos que generan los aromas y sabores típicos a los quesos Cheddar, Emmental y Camembert. Se resaltan los compuestos principales (Yvon y Rijnen, 2001).

Queso Cheddar	Queso Camembert	Queso Emmental
Ácido butanóico	Ácido butanóico	Ácido propanóico
Butirato de Etilo	<b>Ácido isovalérico</b>	<b>Metional</b>
<b>3-Metilbutanal</b>	<b>3-Metilbutanal</b>	Furanol
Ácido propanóico	<b>Metional</b>	Homofuranol
Caproato de Etilo	Diacetilo	Diacetilo
<b>Ácido isovalérico</b>	1-Octen-3-ol	<b>3-Metilbutanal</b>
Ácido acético	1-Octen-3-ona	Butanoato de etilo
<b>Metional</b>	<b>Fenilacetato</b>	
1-Octen-3-ona	2-Undecanona	
<b>Metanotiol</b>	$\gamma$ -Decalactona	
<b>DMDS</b>	<b>Metanotiol</b>	
<b>DMTS</b>	<b>DMTS</b>	
Diacetilo	<b>DMS</b>	
Furanol/homofuranol	<b>Fenilacetaldehído</b>	

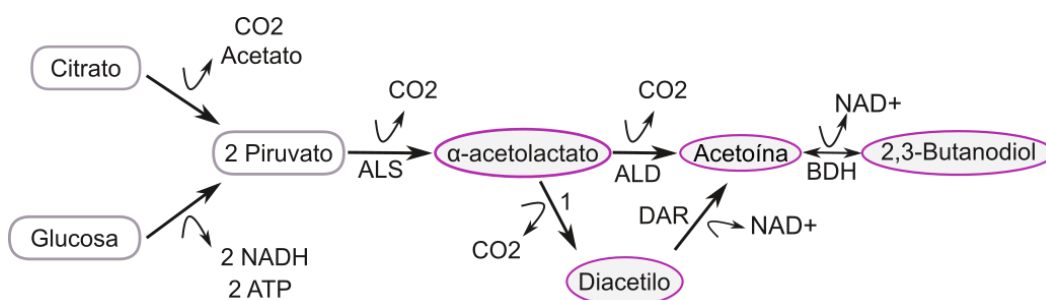
### Producción de aroma a partir de citrato: vías de síntesis de compuestos de cuatro carbonos en BAL

La ruta metabólica involucrada en la biosíntesis de acetoína (2,3-hidroxiбутanona), diacetilo (2,3-butanodiona) y 2,3-butanodiol, todos ellos denominados compuestos de cuatro carbonos o C<sub>4</sub>, ha sido caracterizada en distintas especies bacterianas (Fig. 5). Dentro de las BAL la especie más estudiada, debido a su importancia a nivel industrial, ha sido *L. lactis*.

Las enzimas responsables de la producción de C<sub>4</sub> son la  $\alpha$ -acetolactato sintasa (ALS), que es la enzima que cataliza la reacción de condensación de dos moléculas de piruvato para generar una molécula de  $\alpha$ -acetolactato, la  $\alpha$ -acetolactato descarboxilasa (ALD), que como su nombre lo indica descarboxila el producto de la ALS para dar lugar a la formación de acetoína y dióxido de carbono, y la 2,3-butanodiol deshidrogenasa (BDH), que reduce la acetoína a 2,3-butanodiol en una reacción reversible (Fig. 5).

El  $\alpha$ -acetolactato es un producto altamente inestable y se descarboxila en un modo espontáneo no enzimático en presencia de oxígeno para dar lugar a diacetilo. Por acción de la enzima diacetilo-acetoína reductasa (DAR; Aungpraphapornchai et al., 1999) este compuesto puede ser convertido en acetoína y ésta continuar su reducción (Fig. 5).

*L. lactis* es una bacteria capaz de fermentar citrato junto a glucosa para dar lugar a compuestos C4. Como resultado de la degradación del azúcar, se produce piruvato que puede generar lactato, acetato, etanol y formiato. Tanto el acetato como el formiato se producen a partir del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDH) y por actividad de la piruvato-formiato liasa (PFL), respectivamente. La producción de acetato genera ATP, mientras que la de lactato y etanol regenera las moléculas de  $\text{NAD}^+$  consumidas. Por lo tanto, la fermentación de azúcares produce una disminución del pH consecuencia de los ácidos orgánicos generados.



**Fig. 5. Producción de compuestos C4 en BAL a partir de citrato o glucosa.** Se detallan las vías de producción de los compuestos de aroma a partir del piruvato generado del metabolismo de citrato o de glucosa. Enzimas involucradas en la vía: ALS,  $\alpha$ -acetolactato sintasa; ALD,  $\alpha$ -acetolactato descarboxilasa; DAR, diacetilo-acetoína reductasa; BDH, 2,3-butanodiol deshidrogenasa; 1, descarboxilación oxidativa no enzimática del  $\alpha$ -acetolactato.

Bajo condiciones ácidas, *L. lactis* transporta el citrato al interior celular donde es convertido en última instancia en piruvato. Éste es tomado por la ALS para formar  $\alpha$ -acetolactato y, posteriormente, por la ALD para generar acetoína (García-Quintáns et al., 2008). Esta conversión es esencial para la supervivencia de esta bacteria a pH 4,5, ya que mutantes en la ALS son incapaces de crecer en tales condiciones (Zuljan et al., 2014).

La acidificación que produce el piruvato tanto dentro como fuera de las células impide el crecimiento, mientras que la conversión a compuestos C4 neutros permite a *L. lactis* sobrevivir a los pHs bajos.

La enzima ALS tiene una  $K_m$  aparente para piruvato que se ha estimado en 50 mM para *L. lactis* y en 40 mM para *E. faecalis*, con un pH óptimo de 6 (Snoep et al., 1992b, 1992a). Esto señala una afinidad muy baja por su sustrato, es decir, que la reacción cursaría en el sentido de los compuestos C4 solo en condiciones de acumulación de piruvato en la célula.

Las enzimas DAR y BDH no siempre están presente en las BAL. Para el caso de *L. lactis*, se purificaron dos enzimas con actividad DAR, cada una de ellas utiliza como sustrato diacetilo y acetoína. Sin embargo, estas dos también son capaces de reconocer con menor afinidad al 2,3-butanodiol y así llevar a cabo una actividad BDH (García-Quintáns et al., 2008; Zuljan et al., 2014).

Para el caso de *E. faecalis*, en nuestro laboratorio se han identificado los genes que codifican para la ALS y ALD en la cepa JH2-2, los mismos forman una unidad transcripcional bicistrónica (*alsSD*), dirigida por la región promotora *Pals*. Este operón se induce en la mitad de la fase exponencial de crecimiento y su expresión se ve incrementada en presencia de piruvato. Como sucede en *L. lactis*, cepas mutantes en la ALS exhiben una deficiencia en el crecimiento en presencia de piruvato a pH 5.5 y son incapaces de crecer a pH 4.5, a diferencia de la WT. Nuevamente, la vía de compuestos C4 parece ser un mecanismo importante para contrarrestar el estrés ácido producido durante el crecimiento celular (Repizo et al., 2011).

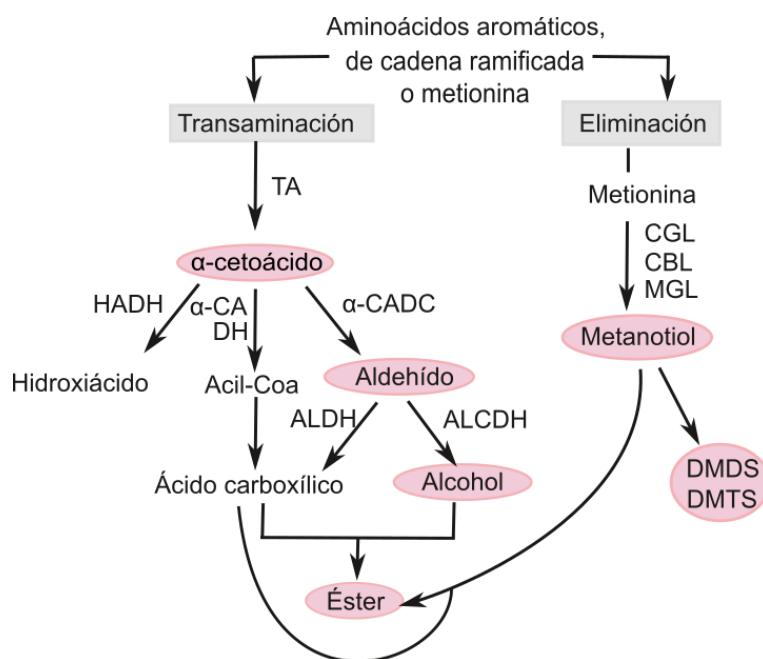
### **Producción de aroma a partir de aminoácidos en BAL**

La degradación de la caseína de la leche se produce tanto por la acción de las enzimas agregadas en la fabricación de quesos como por la de las proteinasas de las BAL. Éstas generan pequeños péptidos que luego pueden ser incorporados por las bacterias por medio de transportadores denominados OPP (del inglés “oligopeptide permease”). A continuación, pueden ser hidrolizados intracelularmente a través de la acción de peptidasas, liberando los aminoácidos que los constituían. En general, los aminoácidos libres y los péptidos no contribuyen de manera significativa al sabor y aroma, sin embargo ciertos péptidos en concentraciones altas pueden dar sabores amargos (Broadbent et al., 2002; Fallico et al., 2005; Karametsi et al., 2014).

La producción de sabor y aroma requiere de la conversión de los aminoácidos libres a alcoholes, aldehídos, ácidos, ésteres y compuestos sulfurados. En la Fig. 6 se

muestran las rutas básicas necesarias para la obtención de los principales productos de degradación de aminoácidos. De todos ellos, los odorantes más potentes son los aldehídos, los ácidos carboxílicos y los ésteres. Especialmente, aquellos producidos a partir de aminoácidos como la metionina, la fenilalanina, la treonina y los de cadena ramificada (Smit et al., 2005).

Las transaminasas son las primeras enzimas participantes en el catabolismo de aminoácidos. Realizan la transferencia del grupo amino del aminoácido hacia un aceptor, para generar el respectivo  $\alpha$ -cetoácido. Usualmente, el aceptor es el  $\alpha$ -cetoglutarato. Para los aminoácidos de cadena ramificada y los aromáticos existen transaminasas específicas, que también suelen actuar sobre la metionina (Engels et al., 2000; Rijnen et al., 1999; Fig. 6).



**Fig. 6. Catabolismo de aminoácidos relevantes para la generación de compuestos aromáticos.** DMDS: dimetil disulfuro; DMTS: dimetil trisulfuro; TA: transaminasa; HADH: hiroxiácido deshidrogenasa;  $\alpha$ -CADH:  $\alpha$ -cetoácido deshidrogenasa;  $\alpha$ -CADC:  $\alpha$ -cetoácido descarboxilasa; ALDH: aldehído deshidrogenasa; ALCDH: alcohol deshidrogenasa; MGL: metionina  $\gamma$ -liasa; CGL: cistationina  $\gamma$ -liasa; CBL: cistationina  $\beta$ -liasa.

A continuación, el  $\alpha$ -cetoácido puede ser oxidado para formar el hidroxiácido o el ácido carboxílico específico. O bien, puede descarboxilarse y general el aldehído. Este último podrá oxidarse para formar un alcohol, que comúnmente reacciona con ácidos para dar lugar a ésteres (Fig. 6).

Los ésteres, como el etilbutirato o feniletilacetato, contribuyen a los sabores de los quesos tipo Cheddar, Gouda y Camembert dando notas florales y frutales, en bajos niveles. Las enzimas responsables de la síntesis de estos compuestos serán las esterasas y lipasas, así como las alcohol acetiltransferasas.

Dentro de los compuestos de aroma derivados de metionina encontramos a los sulfurados como el metional, relevante en el queso cheddar (Dacremont y Vickers, 1994; Singh et al., 2003), el disulfuro de dimetilo y el trisulfuro de dimetilo, que aportan notas de sabor a papa y ajo (Weimer et al., 1999).

A partir de la degradación de leucina se forman el 3-metilbutanal, que en bajas concentraciones da notas frutales y en altas produce gustos desagradables, o al ácido isovalérico, que prevalece en quesos como el Camembert y suizos y da el sabor típico de los quesos estacionados (Yvon y Rijnen, 2001).

De la degradación de fenilalanina se forman el fenilacetaldehído, el 2-feniletanol y el fenilacetato; todos ellos dan notas florales deseadas en quesos como el Camembert pero no en el cheddar (Kubíčková y Grosch, 1997).

No obstante, el principal compuesto de aroma de los quesos es el ácido butanóico, que da los olores típicos a queso, dulce y agradable. Si bien, este ácido se produce principalmente a partir de lipólisis de ácidos grasos, ciertos aminoácidos como la valina generan ácidos carboxílicos similares que producen notas de sabor semejantes (Yvon y Rijnen, 2001).

Por otro lado, la metionina puede sufrir ruptura molecular por medio de liasas. El metanotiol se genera por medio de la metionina  $\gamma$ -liasa (MGL, EC 4.4.1.11), cistationina  $\beta$ -liasa (CBL, EC 4.4.1.8) y la cistationina  $\gamma$ -liasa (CGL, EC 4.4.1.1) (Fig. 6).

Sumadas a las anteriores existen otros tipos de reacciones químicas que pueden ocurrir sobre los aminoácidos y afectan, no tanto al aroma, sino a la calidad del producto final. Tal es el caso de la formación de aminas biogénicas (AB), cuyo consumo en exceso tiene efectos toxicológicos.

Las AB mayoritarias en los alimentos fermentados son la histamina, la tiramina, la putrescina y la cadaverina, que se producen a partir de la descarboxilación de histidina, tirosina, ornitina y lisina, respectivamente. Los genes necesarios para la generación de éstas se han encontrado en diversas BAL, pero su presencia es en general dependiente de la cepa (Spano et al., 2010).

En particular, en nuestro laboratorio hemos demostrado que, en *E. faecalis*, la agmatina (producto de descarboxilación de arginina) induce la expresión de los genes *agu*, para producir putrescina. No obstante, la regulación del operón *aguBDAC* de la cepa JH2-2 estaría indicando que este metabolismo funcionaría favoreciendo el crecimiento celular y la resistencia al pH bajo (Suárez et al., 2013).

## El género *Enterococcus*

Dentro de los miembros del género *Enterococcus* se encuentran los microorganismos más controversiales de las BAL. Estas bacterias han sido históricamente aisladas de fuentes tan diversas como lo son el agua, las plantas o los alimentos.

La gran dispersión en el medio ambiente puede deberse a la gran adaptabilidad ecológica que poseen ya que muchos de los enterococos son capaces de sobrevivir en condiciones adversas de pH, temperatura o salinidad (Lebreton et al., 2014).

Al ser comensales naturales del tracto gastrointestinal de animales (tanto mamíferos como insectos), se ha sugerido que estos microorganismos se han propagado en el medio a través de la materia fecal (Dworkin y Falkow, 2006; Foulquié Moreno et al., 2006; Giraffa, 2002, 2003). Por consiguiente, la presencia de los mismos en los alimentos suele entenderse como determinantes de contaminación.

No obstante, en Europa y Latinoamérica muchos productos fermentados, como quesos o chacinados, poseen enterococos como microbiota natural relevante para la calidad del producto final (Foulquié Moreno et al., 2006; Franz et al., 1999, 2003, 2011; Giraffa, 2002).

Los enterococos típicos (*E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae* y *E. mundtii*) pueden diferenciarse fácilmente de otros cocos Gram positivos, catalasa negativos, homofermentativos por su habilidad para crecer tanto a 10 como a 45°C, en 6.5% de NaCl, en presencia de 40% de bilis y a pH 9.6. Sin embargo, las especies recientemente descritas, varían en su fisiología, lo que dificulta su identificación por métodos tradicionales (Devriese et al., 1993, 2002).



### Filogenia de las especies incluidas en el género *Enterococcus*

El género *Enterococcus* se encuentra filogenéticamente contenido dentro de las eubacterias Gram positivas de bajo contenido de G+C, dentro la división *Clostridium* – *Bacillus*. Se encuentra, junto con los géneros *Melissococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*, dentro de la familia Enterococcaceae (Dworkin y Falkow, 2006). Originalmente, las bacterias del género *Streptococcus* que pertenecían al subgrupo de “estreptococos fecales” o “grupo D de Lancefield” se dividieron en tres géneros distintos: *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus*, de acuerdo a las técnicas de clasificación de la época (Devriese et al., 1993; Ludwig et al., 1985; Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984). De modo tal que, a excepción de la especie *Streptococcus thermophilus*, todas las bacterias patógenas quedaron agrupadas dentro del primer género, las de importancia tecnológica en el segundo y las asociadas al tracto gastrointestinal y otros hábitats variables, en el tercero.

Desde entonces, y principalmente por medio de la secuenciación de ARNr 16S, más de 35 especies de enterococos han sido descritas y continúan siendo revisadas. Actualmente, como consecuencia de la amplia disponibilidad de datos de secuencia de nucleótidos de genomas completos el número de especies identificadas se elevó considerablemente.

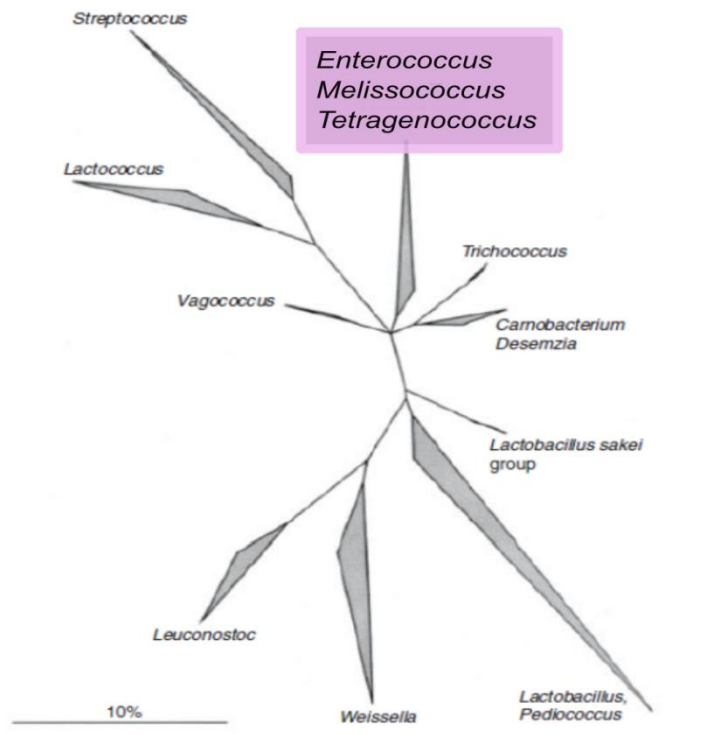


Fig. 7. Árbol filogenético construido utilizando las secuencias de gen del ARNr 16S de especies de BAL, extraído de Dworkin y Falkow (2006). Se indica con un recuadro a los géneros contenidos dentro de la familia Enterococcaceae.

De acuerdo a los árboles filogenéticos construidos en base a esta tecnología, dentro del mismo género se han definido subgrupos de especies altamente relacionadas entre sí (Dworkin y Falkow, 2006; Franz et al., 2003, 2011):

**Grupo *E. faecium*:** *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. villorum*, *E. ratti*.

**Grupo *E. avium*:** *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*.

**Grupo *E. gallinarum*:** *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*.

**Grupo *Enterococcus dispar*:** *E. asini*, *E. dispar*.

**Grupo *Enterococcus saccharolyticus*:** *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus*.

**Grupo *Enterococcus cecorum*:** *E. cecorum*, *Enterococcus columbae*.

**Grupo *E. faecalis*:** *E. faecalis*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*.

#### **Grupo *E. faecium***

Originalmente, el grupo *E. faecium* solo contenía a las especies *E. faecium*, *E. hirae*, *E. mundtii* y *E. durans* (Dworkin y Falkow, 2006). Posteriormente, *E. ratti*, *E. porcinus* y *E. villorum* fueron identificadas y adicionadas a las anteriores (Teixeira et al., 2001; Vancanneyt et al., 2001). Luego, *E. porcinus* y *E. villorum* se demostraron como

una misma especie, conservándose para todos estos microorganismos el nombre de la segunda (De Graef et al., 2003).

De todas ellas, *E. faecium* ha sido la especie mayormente estudiada como consecuencia del aumento en el número de infecciones intrahospitalarias detectadas en los últimos años provocadas por estas bacterias (Hidron et al., 2008). La prevalencia de estos enterococos en los hospitales se debe, probablemente, a la gran variedad de resistencias antibióticas y de factores de virulencia que poseen. En contraste, el resto de los miembros del grupo *E. faecium* raramente provocan enfermedades en seres humanos (Agudelo Higueta y Huycke, 2014).

### Aplicaciones industriales

Los *Enterococcus* no son utilizados generalmente para iniciar los procesos fermentativos; en cambio, forman parte de la denominada microbiota adventicia, es decir, que se encuentran presentes desde el comienzo de la fermentación en la materia prima de la producción. Tradicionalmente y dentro de este género, *E. faecalis* y *E. faecium* han sido las especies aisladas en los alimentos fermentados mayoritariamente (Foulquié Moreno et al., 2006). A su vez, *E. durans* también ha sido frecuentemente identificada en quesos (Ogier y Serror, 2008).

El rol de las cepas NSLAB no está claramente definido y en ciertas ocasiones se les adjudica la no predictibilidad en la calidad final de los productos fermentados. Por ejemplo, se ha asociado a la microbiota adventicia la formación de cristales de lactato y defectos de textura en el queso cheddar (Lynch et al., 1996).

De todos modos, muchos países de Latinoamérica y Europa consideran la contribución de estos cocos a la formación de sabores y de aromas positiva, particularmente en quesos como el cheddar o el feta (Foulquié Moreno et al., 2006; Sarantinopoulos et al., 2002). Ha sido reportado que los enterococos presentes en la leche, a través de actividades lipolíticas, peptidolíticas y por medio de la producción de compuestos de aroma de cuatro carbonos, mejoran las propiedades organolépticas de los alimentos fermentados (De Vuyst et al., 2011; Giraffa, 2003; Repizo et al., 2013, 2014; Settanni y Moschetti, 2010).

A su vez, la presencia intrínseca de los enterococos en alimentos tiene ventajas desde el punto de vista de la seguridad alimenticia, ya que muchos de ellos son capaces

de producir bacteriocinas, denominadas enterocinas, durante su crecimiento (Lauková et al., 2015). Éste es un recurso valioso a nivel industrial para el control del crecimiento de bacterias indeseadas. Además, es una característica propia de bacterias beneficiosas para la salud humana, como lo son los probióticos (Dobson et al., 2012; Kanmani et al., 2013).

Debido a que las cepas de *Enterococcus* no son consideradas seguras para el consumo humano, no se las prefiera para ser utilizadas como probióticos. Sin embargo, encontramos descritas en la literatura muchas de ellas cuyas cualidades las hacen buenas candidatas para tal fin. Algunas en particular ya se utilizan comercialmente como probióticas, en especial en la regulación de procesos de diarrea y animales (Benyacoub et al., 2003; Franz et al., 2011; Guo et al., 2016; Natarajan y Parani, 2015; Sun et al., 2010).

De cualquier modo, el número creciente de enterococos capaces de producir enfermedades, así como las múltiples resistencias antibióticas que portan, cuestionan el uso de los mismos en la industria alimenticia (Kristich et al., 2014). La Autoridad Europea en Seguridad Alimenticia (EFSA) ha reevaluado en los últimos años la lista de microorganismos recomendados para ser adicionados a alimentos humanos o de animales. Los enterococos fueron excluidos de la lista QPS (del inglés “qualified presumption of safety”, cepas presuntas como seguras; EFSA, 2012), a pesar del conocimiento científico acumulado en favor de dichos microorganismos, y de la evidencia cada vez mayor acerca de las separaciones existentes entre las cepas clínicas con aquellas no-patogénicas. No obstante, la Unión Europea autoriza el uso de ciertas cepas de *E. faecium* en alimentos para animales (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2012).

De este modo, la contribución al conocimiento e información respecto de la diversidad, seguridad y plasticidad genómica de las cepas de *Enterococcus*, así como la diferenciación entre la capacidad patogénica dentro de las especies del género, y de subpoblaciones dentro de las especies es de vital importancia a la hora de considerar cepas particulares para usos específicos en alimentos.

### Enterococos como patógenos emergentes

Los enterococos, aunque no son particularmente virulentos, en las últimas décadas han adquirido importancia como patógenos oportunistas intrahospitalarios. Es decir que, pueden provocar enfermedades en pacientes comprometidos inmunológicamente, que cursan tratamientos prolongados con antibióticos, con enfermedades severas subyacentes o bien con un sistema inmune debilitado (Agudelo Higueta y Huycke, 2014).

La primera descripción de estas bacterias como oportunistas fue en 1899 (MacCallum y Hastings, 1899), en un caso de endocarditis. Desde entonces han sido detectadas como causal frecuente de esta enfermedad. De hecho, los enterococos como agentes de infección se manifiestan mayormente en casos de endocarditis, bacteriemia e infecciones en el tracto urinario (Agudelo Higueta y Huycke, 2014; Arias y Murray, 2012; Hidron et al., 2008; Nigo et al., 2014).

Además, suelen aislarse cepas de *Enterococcus* en infecciones intrabdominales, pélvicas y de tejido blando, aunque en general se encuentran formando parte de una flora microbiana mixta, siendo incapaces de establecer infecciones en estos sitios por sí solos. En tales casos, no está establecido si los enterococos juegan un rol importante en el desarrollo de la infección, o bien, como microorganismos oportunistas, participan solo como “espectadores” (Agudelo Higueta y Huycke, 2014).

Las dos especies clínicamente predominantes son *E. faecalis* y *E. faecium*. En Estados Unidos, en la década de 1970, *E. faecalis* se aislaba entre el 90 y 95% de los casos de infecciones intrahospitalarias. Posteriormente, a comienzos de los '90, con el aumento del uso de vancomicina y antibióticos de amplio espectro, *E. faecium* comenzó a predominar como agente infeccioso nosocomial, siendo hoy en día el enterococo más común en hospitales de este país (Arias y Murray, 2012). De hecho, el número de cepas de *E. faecium* resistentes a vancomicina supera ampliamente el número de cepas resistentes en *E. faecalis*, así como también, al de cepas de *E. faecium* resistentes a ampicilina (Top et al., 2008).

En Latinoamérica, se encontró que la mayoría de las infecciones causadas por *Enterococcus* (78 %, aproximadamente) aún son causadas por cepas de *E. faecalis* susceptibles a vancomicina y ampicilina, y que solo un 22 % aproximadamente son

causadas por linajes genéticos de *E. faecium* multiresistentes, similares a los observados en Estados Unidos (Panesso et al., 2010).

Pese a ello, no todas las cepas de *E. faecium* son resistentes a antibióticos y pueden potencialmente causar infecciones. Recientes estudios comparativos de los genomas disponibles de esta especie (Galloway-Peña et al., 2012; Willems et al., 2012), describen una división en la población de *E. faecium* en dos grandes ramas, A y B. En la primera podemos hallar gran parte de las cepas de origen clínico o animal, mientras que en la segunda a aquellas cepas comensales de humanos, mayoritariamente. Cabe aclarar, que esta separación en ramas no es absoluta, sino que permite ciertas excepciones, habiendo cepas de orígenes y ramas cruzados. Estudios posteriores mejoraron la clasificación al agregar subdivisiones en la rama A (Lebreton et al., 2013). El nuevo grupo A1 contendría a cepas clínicas modernas emergidas en consecuencia del uso de antibióticos a partir de las cepas del A2, que contendría a aquellas derivadas de animales. Y a su vez, el grupo A2 provendría de la rama B, que contiene a la mayor parte de las cepas comensales humanas (Lebreton et al., 2013).

Conjuntamente, las técnicas de tipificación actuales han permitido otra clasificación de las cepas de *E. faecium* en grupos denominados ST (por las siglas en inglés de “sequence type”) obtenidos por análisis de MLST (por las siglas en inglés de “multi locus sequence typing”). Esta técnica se ha aplicado principalmente para el estudio de la epidemiología de *E. faecium*, es decir, con la intención específica de tipificar brotes hospitalarios. El MLST se basa en la identificación de alelos de genes constitutivos que, por sus variaciones, permiten hacer un perfil diferencial de tipos de cepa. A cada perfil diferente se le asigna, entonces, un ST (Maiden et al., 2013). Actualmente, existen sitios web que permiten asignar el grupo ST fácilmente ([www.pubMLST.org](http://www.pubMLST.org) o [www.cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/](http://www.cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/)).

Homan y colaboradores (2002), describen un esquema de MLST para *E. faecium* que permite separar las cepas existentes en diferentes linajes. El linaje A agrupa a ST que contienen cepas de humanos no hospitalizados y cerdos, el linaje B contiene a ST de cepas de aves de corral, el linaje C posee ST de cepas de fuentes variadas (donde podemos hallar tanto cepas de humanos hospitalizados, como de animales) y el linaje D ST pertenecientes a terneros. Dentro del grupo C, se puede distinguir una subpoblación denominada C1 relacionada a brotes intrahospitalarios. Dentro de este subgrupo

encontramos a los ST 16, 17, 18 y 20. El ST17 se ha predicho como el fundador del linaje C1, por lo cual ha recibido el nombre de complejo clonal 17 (CC17) (Top et al., 2008). Este CC17 es de relevancia clínica, ya que contiene a cepas de *E. faecium* de brotes hospitalarios de los 5 continentes, que poseen resistencias a ampicilina y a quinolonas y una isla de patogenicidad putativa (que contiene, en la mayoría de los aislamientos, el gen de virulencia *esp*; Top et al., 2008).

Respecto de los mecanismos de infección y colonización en *Enterococcus*, la mayor parte de los trabajos se han hecho sobre *E. faecalis*. Como parte de la microbiota intestinal normal, es capaz de cruzar la barrera epitelial intestinal e ingresar al torrente sanguíneo y se considera que los macrófagos serían el vehículo utilizado para la invasión y diseminación (Wells et al., 1990; Zeng et al., 2004). Para sobrevivir en los macrófagos, las bacterias se deben adaptar a este ambiente intracelular, soportando el arsenal de defensas del huésped, que incluye la producción de especies reactivas de oxígeno y el bajo pH del fagosoma (Dubnau y Smith, 2003). De todos modos, la forma más común de infección es a través del tracto urinario, por medio de catéteres y sondas (Agudelo Higuera y Huycke, 2014).

Muchos factores de virulencia han sido identificados en los últimos años, inicialmente en *E. faecalis*; luego, se han hallado homólogos en *E. faecium* (Cariolato et al., 2008; Leavis et al., 2004; Ogier y Serror, 2008; Rigottier-Gois et al., 2011; Toledo-Arana et al., 2001; Vankerckhoven et al., 2004).

Dentro de los factores de virulencia más comunes encontramos adhesinas de colágeno Ace y Acm (Toledo-Arana et al., 2001), sustancias de agregación AS, citolisinas Cyl, proteínas de fijación a superficies Esp, gelatinasa GelE (Di Rosa et al., 2006; Hällgren et al., 2009; Vankerckhoven et al., 2004), proteínas de pili Ebp, (Nallapareddy et al., 2011; Sillanpää et al., 2010) y hialuronidasas Hyl (Kayaoglu y Ørstavik, 2004; Rice et al., 2003). En general, la mayoría de los factores de virulencia en enterococos están relacionados a la adhesión y formación de biofilm.

### ***Galleria mellonella* como modelo de infección**

Históricamente, el uso de animales invertebrados ha sido una gran herramienta en la construcción de modelos de interacción hospedador-patógeno. Han permitido

ampliar los conocimientos acerca de los principios subyacentes a los procesos infecciosos y a las respuestas de los hospedadores, generando resultados relevantes acerca de los procesos implicados en la infección en mamíferos (Casadevall, 2005; Lemaitre et al., 1996; Vogel, 2012).

Así como el gusano de la seda (*Bombyx mori*) o la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), la polilla grande de la cera (*G. mellonella*) es un insecto utilizado como animal invertebrado modelo. A diferencia de los modelos tradicionales, como el ratón *Mus musculus* (cordado mamífero) o el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans* (del orden de los Rhabditida), los insectos ofrecen nuevas ventajas a la hora de su manipulación y uso en experimentación, como se describirá a continuación.

### **Ciclo de vida y fisiología**

*G. mellonella* es un animal que puede hallarse en gran diversidad de ambientes a lo largo del mundo. Se destaca por ser plaga de las colmenas de abejas melíferas, hecho por el cual se ganó la denominación popular de “polilla grande de la cera”. Su presencia es perjudicial en los apiarios, ya que, una vez que la larva penetra en los panales, destruye la integridad de la colmena, alimentándose de la misma, al tiempo que va labrando galerías tapizadas en una trama sedosa (Fig. 8).

*G. mellonella* atraviesa cuatro fases bien definidas durante su ciclo biológico. El insecto adulto es una polilla o mariposa que se encuentra diferenciada en dos sexos (Fig. 9C). Los machos son ligeramente más pequeños que las hembras, las cuales suelen ser más oscuras y con un aparato bucal más agudo. El tamaño final del adulto puede variar según las condiciones de alimentación y salud en su etapa juvenil. La cópula entre dos adultos ocurre dos o tres días después de la emergencia de los mismos. A continuación, las hembras realizan la oviposición sobre las paredes de los panales. Cada hembra puede llegar a depositar hasta 300 huevos. Luego del apareamiento el macho muere, así como también lo hace la hembra, solo luego de poner los huevos (Urretabizkaya et al., 2010).





**Fig. 8. "Galerías" formadas en un panal de abeja.**

Un adulto puede llegar a vivir 3 semanas. Los huevos eclosionan al cabo de una semana (en condiciones ideales) para dar lugar a una larva de tan solo unos pocos milímetros de longitud, apenas visible por el ojo humano. El desarrollo larval varía de 1 a 4 meses. Durante ese tiempo la larva solo se dedica a alimentarse para así aumentar de tamaño y peso. En su máximo desarrollo alcanza a medir de 2 a 3 cm de longitud (Fig. 9A). Presenta la cabeza rojiza y el resto del cuerpo blanco o gris claro. Llegado al período de madurez, la larva atraviesa la fase de pupa en donde comienza a tejer una crisálida o capullo (Fig. 9B) en el cual sucederá su metamorfosis a insecto adulto (Urretabizkaya et al., 2010).

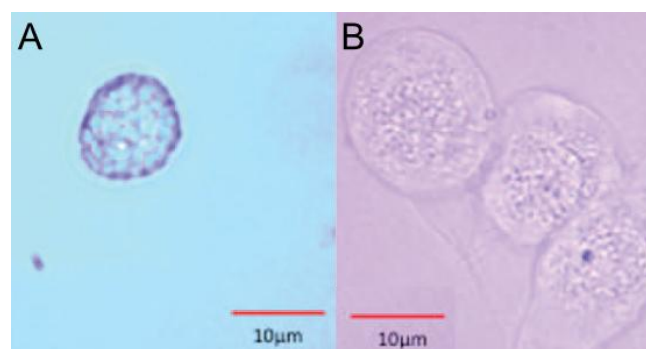
A priori, podríamos decir que los sistemas inmunes de los vertebrados se han diferenciado evolutivamente de los de invertebrados al desarrollar la respuesta inmune adaptativa. No obstante, la respuesta inmune innata presente en ambos grupos es un sistema de defensa común distribuido en todas las especies, sean animales o vegetales. Por consiguiente, se podría asumir que los mecanismos involucrados en esta respuesta primitiva son, esencialmente, los mismos en todos los organismos (Salzet, 2001).



**Fig. 9. Ciclo de vida de *G. mellonella*.** Las larvas de *G. mellonella* (A) se alimentan y crecen hasta alcanzar la fase en la que forman una crisálida o pupa (B) de la cual emergerán los insectos adultos (C). Se muestran en C), a la izquierda una hembra y a la derecha un macho.

La respuesta innata en los insectos lepidópteros consiste en una barrera mecánica inicial (la cutícula, compuesta por una pro-cutícula y la epidermis) y dos tipos de respuestas fisiológicas, una celular y una humoral.

En la respuesta celular participan las células denominadas hemocitos. Éstas existen en seis tipos diferentes: prohemocitos, plasmátocitos, granulocitos, coagulocitos, oenocitoides y esferulocitos (Browne et al., 2013; Kavanagh y Reeves, 2004; Wojda, 2016). Todas cumplen roles diferentes y se encuentran circulando en la cavidad corporal del insecto, suspendidas en la hemolinfa. Los hemocitos de mayor relevancia en la respuesta celular son aquellos con capacidad para fagocitar elementos extraños, es decir, los plasmátocitos y los granulocitos (Fig. 10). Los primeros son aquellos que poseen mayor capacidad fagocítica pero son menos abundantes en lepidópteros, mientras que los segundos, los mayoritarios, tienen una capacidad de fagocitosis reducida (Lackie, 1988; Pech y Strand, 1996; Tojo et al., 2000).



**Fig. 10. Microscopía de hemocitos recuperados de hemolinfa de larvas de *G. mellonella*. A) Granulocito, B) plasmátocitos, extraído de Browne y colaboradores, (2013).**

En la respuesta humoral la defensa está a cargo de partículas. La evidencia más clara de este tipo de respuesta es la melanización de la larva. La melanina es un pigmento oscuro que cuando se produce *in vivo* presenta efectos bactericidas (Dubovskiy et al., 2013). La enzima responsable de su producción se denomina fenoloxidasas que, como su nombre indica, oxida fenoles para que polimericen formando el pigmento. La forma inactiva de esta enzima (profenoloxidasas) se sintetiza dentro de los oenocitoides y se libera a la hemolinfa como consecuencia de la lisis celular. La profenoloxidasas es activada a través de una cascada de serínproteasas y transportada hacia la cutícula o alrededor de una herida o microorganismos exógenos (Kavanagh y Reeves, 2004; Wojda, 2016).

De modo tal que, la melanización es tanto un indicador de daño celular como de infección. Es así como, las larvas que sobrellevan un proceso infeccioso o crecen en condiciones no óptimas adoptan una coloración más oscura como consecuencia de este proceso fisiológico.



**Fig. 11. Melanización de la cutícula en larvas de *G. mellonella*.** Se observan las diferencias entre larvas sanas (A) y larvas que sobrellevan un proceso infeccioso (melanización generalizada; B) o presentan una lesión (melanización localizada; C).

### Ventajas y validación del modelo

La utilización de modelos invertebrados sencillos para el estudio de las interacciones hospedador-patógeno se fundamenta en dos premisas primordiales. Por un lado, cuando un microorganismo patógeno expresa los mismos factores de virulencia en distintos hospedadores está sugiriendo que los mecanismos de su patogénesis son, en general, independientes del hospedador. Del mismo modo, si el mismo patógeno provoca respuestas defensivas similares en hospedadores tanto vertebrados como invertebrados, se deduce que los mecanismos innatos de inmunidad contra ese organismo particular están conservados a través de los metazoos (Yuen y Ausubel, 2014).

El uso del insecto *G. mellonella* como animal modelo no es algo reciente. Ya en 1937 se la eligió para estudios genéticos por su capacidad de supervivencia aún frente a condiciones adversas, así como por su naturaleza altamente proliferativa y su adaptabilidad al ambiente de laboratorio (Smith, 1938). A partir de allí, varios efectores relacionados en la patogénesis y virulencia de diferentes microorganismos han validado al insecto como modelo experimental (Fedhila et al., 2006; Gaspar et al., 2009; Jander et al., 2000; Mukherjee et al., 2010, 2011; Mylonakis et al., 2005).

La facilidad con la que se manipulan las larvas en relación a otros modelos, los bajos costos de cría y su condición como modelo animal éticamente aceptado son algunas de las ventajas que presenta frente a modelos. No obstante, la mayor ventaja se encuentra en la posibilidad de crecer las larvas a 37°C, temperatura a la cual los patógenos humanos están adaptados, y por ende importante para la producción de muchos factores de virulencia (Cook y McArthur, 2013). Además, al tratarse de un insecto, y en contraste con los nematodos que carecen de una respuesta inmune celular fagocítica (Ermolaeva y Schumacher, 2014), posee tanto una respuesta inmune humoral como celular, convirtiéndolo en un modelo atractivo para el estudio de las interacciones bacteria-hospedador (Kavanagh y Reeves, 2004; Wojda, 2016).

### Curvas de Kaplan-Meier

Los análisis de Kaplan-Meier (K-M; Kaplan y Meier, 1958) permiten la construcción de las clásicas curvas de supervivencia. Estas gráficas permiten comparar los eventos que se sucedan en un grupo de individuos bajo estudio, sin importar que los mismos posean diferentes tamaños de muestra, y admiten pérdidas de casos durante el tiempo de ensayo.

Los análisis de supervivencia realizados con *G. mellonella* requieren de la inoculación de grupos de larvas con microorganismos y de la posterior estimación de las diferencias en sus efectos a través de las curvas de K-M. Así, el porcentaje de individuos sobrevivientes a un tratamiento, sumado a las estimaciones estadísticas, permiten concluir si un microorganismo es más virulento que otro.

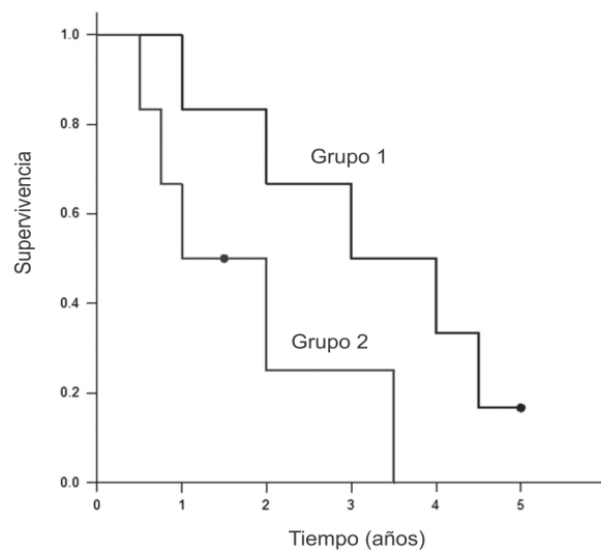
Las inoculaciones en *G. mellonella* se pueden realizar a través de diferentes metodologías. La seleccionada en este trabajo de tesis, y elegida preferencialmente en términos generales, es la inyección directa de un inóculo en la cavidad corporal (inyección a hemolinfa). De esta manera se permite conocer con exactitud y precisión la cantidad de inóculo introducida en la larva.

Cuando se llevan a cabo diferentes inoculaciones sobre varios grupos, la supervivencia de los individuos se monitorea en el tiempo. Con los datos recolectados luego se construyen las curvas de K-M.

De este modo, cada grupo de larvas va formar una curva construida con los datos recogidos de los sucesos individuales de los miembros del grupo. En los análisis de K-M, a cada larva se la caracterizará con tres variables (Rich et al., 2010):

- 1) su tiempo serial: desde el comienzo del estudio hasta que sucede el evento de interés (en este caso en particular la muerte) o finaliza el estudio
- 2) su estado al final del tiempo serial: ocurrencia del evento o censura, en este caso la censura se corresponde con la finalización del experimento antes de que muera la larva
- 3) el grupo al que pertenece: en este caso corresponderá a la cepa y al valor de UFC con el que se inocula al grupo.

Una curva de K-M típica se muestra en la Fig. 12. La longitud de las líneas horizontales a lo largo del eje x, correspondiente al tiempo serial, representa la duración de la supervivencia hasta que ocurre el evento de interés. Las distancias verticales entre líneas horizontales ilustran los cambios en la probabilidad acumulada a medida que avanza la curva. Los sujetos censurados se muestran como puntos negros.



**Fig. 12.** Curva de Kaplan-Meier generada correspondiente a un estudio de 5 años con 6 sujetos en cada grupo. Tomada de (Rich et al., 2010).

Para comparar curvas de supervivencia se realiza un test de log-rank que calcula un valor de P. Éste se utiliza para determinar si la diferencia es significativa o es el producto de la variabilidad propia del muestreo (Rich et al., 2010). Si este valor de P es menor al establecido como umbral, se procede a realizar una comparación múltiple de

datos, que permite establecer si pares de curvas son estadística y significativamente diferentes.

## Objetivos

## Objetivo general

Los enterococos constituyen el grupo más controversial dentro de las bacterias lácticas presentes en alimentos ya que, en las últimas décadas, han emergido como patógenos oportunistas. Como tales, no son considerados seguros para el consumo humano y por lo tanto, requieren de un análisis cepa por cepa para su selección y potencial uso en alimentos.

Se propuso como objetivo general de este trabajo de tesis analizar la contribución a la calidad final de los alimentos de los microorganismos pertenecientes al género *Enterococcus*. Se indagarán las vías degradativas involucradas en la generación de aromas y la participación de las mismas en la sobrevivencia de estos microorganismos en diferentes condiciones. Además, nuevas técnicas de análisis de secuencia de genomas completos se utilizarán sobre enterococos aislados de alimentos regionales con el propósito de alcanzar una selección racional de bacterias de acuerdo a sus características y propiedades.

## Objetivos específicos

- Analizar el aporte del metabolismo de citrato de *Enterococcus faecalis* en los procesos de infección utilizando modelos y fluidos animales.
- Estudiar y analizar la diversidad genética de la vía del metabolismo de citrato y producción de diacetilo en cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de quesos regionales.
- Seleccionar y descartar microorganismos destinados potencialmente a la producción de alimentos utilizando nuevas herramientas bioinformáticas y análisis fenotípicos.



## Materiales y métodos

## Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

En las tablas siguientes se detallan las cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos empleados durante el desarrollo de la presente Tesis.

**Tabla 2.** Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo

Cepas bacterianas	Fenotipos o genotipos	Referencias
<i>E. faecalis</i> JH2-2	Cit <sup>+</sup> ; Rif <sup>R</sup> ; Fus <sup>R</sup> ; libre de plásmidos	(Jacob y Hobbs, 1974)
<i>E. faecalis</i> JH-pTLGR	Cepa JH2-2 transformada con el plásmido reportero pTLGR	Este trabajo
<i>E. faecalis</i> JH-pTLGR-Pcit	Cepa JH2-2 transformada con el plásmido reportero pTLGR-Pcit	Este trabajo
<i>E. faecalis</i> JHCit <sup>-</sup>	Mutante generada por inserción del plásmido pGhost9 sobre el gen <i>citD</i> derivada de la cepa JH2-2, resistente a eritromicina (Em <sup>R</sup> )	Cepa disponible en el laboratorio.
<i>E. faecalis</i> JH2-2-OadA <sup>-</sup>	Mutante por eliminación del gen <i>oadA</i> , derivada de la cepa JH2-2	(Repizo et al., 2013)
<i>E. faecalis</i> JH2-2-OadB <sup>-</sup>	Mutante por eliminación del gen <i>oadB</i> , derivada de la cepa JH2-2	(Repizo et al., 2013)
<i>E. faecalis</i> JH2-2-MaeR <sup>-</sup>	Mutante por eliminación del gen <i>maeR</i> , derivada de la cepa JH2-2	(Mortera et al., 2012)
<i>E. durans</i> IQ23	Cit <sup>+</sup> , originaria de alimento	(Quintana, 2013)
<i>E. faecium</i> GM75	Cit <sup>+</sup> , originaria de alimento	Este trabajo
<i>E. faecium</i> IQ110	Cit <sup>-</sup> , originaria de alimento	(Quintana, 2013)
<i>E. faecium</i> GM70	Cit <sup>+</sup> , originaria de alimento	Este trabajo
<i>L. lactis</i> IL1403	Derivada de la cepa IL594 curada de plásmidos, Trp <sup>+</sup>	(Chopin et al., 1984)
<i>E. faecium</i> Com12	Cit <sup>+</sup> , comensal humana	(Palmer et al., 2010)
<i>E. coli</i> DH5α	fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17, usada como un hospedador intermedio para clonados	(Hanahan, 1983)

**Tabla 3.** Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
pGhost9	Plásmido termosensible, Em <sub>R</sub>	(Maguin et al., 1996)
pTLGR	Derivado del plásmido pAK80, contiene el gen modificado <i>mrfp</i> y el gen <i>gfp</i> para estudio de promotores, Em <sub>R</sub>	(García-Cayuela et al., 2012)
pTLGR-Pcit	pTLGR con los promotores de los genes <i>cit</i> de la cepa JH2-2	Este trabajo

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótido	Secuencia	Descripción
Faecium_citI_UP	TGATGAATTCACCATTGATATTGAAGG	Par de oligonucleótidos que amplifican la región conservada del gen <i>citI</i> de <i>E. faecium</i>
Faecium_citI_Lo	AATTAAGCTTGCCAATGTGGTTGC	
Faecium_citO_UP	GGTACGCGAATTCACGAAAAAG	Par de oligonucleótidos que amplifican la región conservada del gen <i>citO</i> de <i>E. faecium</i>
Faecium_citO_Lo	GAGGAAGCTTTGGCAATATCACG	
CL_faecalis_Up	AGAGAATCCATGATGTTTGTCCCTG	Par de oligonucleótidos que amplifican específicamente el gen <i>citE</i> de <i>E. faecalis</i>
CL_faecalis_Lo	GAAGTAAGCTTGGTGACTACTCCATTT	
CitIf	ACAGGGATCCTTTGGAGGATTTTACATGAC	Par de oligonucleótidos que amplifican la región intergénica <i>citI-citM</i> en <i>E. faecium</i> y <i>E. durans</i>
CitMr	ACAGGGATCCGGCTTCTGTTGTTTCC	
BamHprom_Up	AGGGGATCCATTACTAAAGATGTAAAC	Par de oligonucleótidos que amplifican la región intergénica <i>citH-oadH</i> de <i>E. faecalis</i> JH2-2
BamHprom_Lo	TTAGGATCCTAAATATTCTTTCCC	

## Soluciones y medios de cultivos

### Medios de cultivo

El medio LB se preparó con la siguiente composición: peptona de caseína 10,0 g/l, extracto de levadura 5,0 g/l, NaCl 10,0 g/l, ajustado a pH 7 o 5.5 (Sambrook et al., 1989).

El medio SMM (skimmed milk medium) se preparó con 100 g/L de leche en polvo descremada, 10 g/L de peptona, 5 g/L extracto de levadura (De Vuyst et al., 1998)

El medio M17 se preparó de acuerdo a la siguiente composición: peptona de soja 5,0 g/l, peptona de caseína 5,0 g/l, extracto de levadura 2,5 g/l, extracto de carne 5,0 g/l, ácido ascórbico 0,5 g/l,  $\beta$ -glicerofosfato de sodio 19 g/l (Terzaghi y Sandine, 1975). El medio fue ajustado a pH 7.

### Soluciones inorgánicas

Se utilizaron las siguientes soluciones para la resuspensión de cultivos bacterianos o hemocitos:

- Solución tampón fosfato de potasio (Kpi) 50mM ajustado a pH 7 o 5,8.
- Solución salina de fosfato (PBS) 1x, compuesta por 8g/l de NaCl, 0,2g/l de KCl, 1,44 g/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0,24 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . El pH final se ajustó a 7,3.
- Solución fisiológica salina de insectos (IPS), compuesta por 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 10 mM de tris HCl pH 6.9, 10 mM de EDTA

## Crecimiento bacteriano

### Condiciones de crecimiento

Las células de *E. coli* se cultivaron en medio LB a 37°C en medio aeróbico con agitación vigorosa. Las células de enterococos se cultivaron en medio LB suplementado con glucosa 30mM (LBG), citrato 15mM (LBC), con ambos (LBGC), con piruvato 100 mM (LBP), con ribosa 30 mM (LBR) o citrato y el anterior (LBRC), a 37°C en aerobiosis sin agitación. EL pH se ajustó a 7 o 5.5 según lo especificado para cada experimento. En el caso de los cultivos en microplaca estéril (Cellstar) la incubación se realizó en el lector

de microplacas PowerWave XS (BioTek), a 37°C, donde se midió la DO<sub>600</sub> cada 15 minutos, toda una noche. El volumen final en cada pocillo fue de 200 µl

Para cultivos de bacterias ácido lácticas, en todos los casos se partió de un cultivo saturado, incubado durante toda la noche. Luego, las células fueron cosechadas, resuspendidas en medio fresco y la cantidad adecuada de suspensión, necesaria para dar una DO<sub>600</sub> inicial de 0,08-0,1, fue inoculada en el volumen deseado de medio fresco. La incubación se continuó hasta que el cultivo alcanzó la DO<sub>600</sub> requerida en cada caso.

En caso de ser necesario, se adicionó eritromicina al medio de cultivo a una concentración de 5 µg/ml.

### **Puesta en competencia y transformación de cepas bacterianas**

Las células de *E. faecalis* fueron transformadas por electroporación siguiendo los métodos descritos para *L. lactis* (Dornan y Collins, 1990). Se empleó el equipo Gene Pulser Xcell más el PC Module (Bio-Rad) para tal fin. Las condiciones de electroporación utilizadas fueron las siguientes: 25 µF, 2,5 kV y 200 Ω. Para el crecimiento de las cepas de *E. faecalis* antes de ser electroporadas, se utilizó el medio M17 suplementado con glucosa 0,5 % P/V (M17G) y glicina al 1,5% P/V y sacarosa 0,5 M. Después de su electroporación las células se incubaron en 1 ml de M17G suplementado con sacarosa 0,5 M durante 1 h a 37°C. Luego se procedió a la detección de las transformantes en medio sólido por selección de resistencia a los antibióticos. Las células de *E. coli* fueron transformadas con ADN plasmídico utilizando el procedimiento de cloruro de calcio (Sambrook et al., 1989).

## **Manipulación de ADN**

### **Extracción de ácidos nucleídos**

Para la obtención de ADN plasmídico de *E. coli* se siguió el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989) para preparar ADN plasmídico en pequeña escala. Las preparaciones de ADN plasmídico utilizadas para las reacciones de secuenciación se obtuvieron a partir del equipo provisto por Promega (Wizard Kit, Promega) siguiendo las indicaciones del laboratorio fabricante.

Para la extracción de ADN genómico total, utilizado en las reacciones de secuenciación, se extrajo ADN de cultivos bacterianos saturados por medio Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para las reacciones en cadena de la ADN polimerasa (PCR) se utilizó un protocolo rápido de extracción de ADN total. Se utilizaron 1 a 2 ml de cultivo saturado. Las células fueron cosechadas por centrifugación durante 2 min a 4000 rpm. Luego, se lavaron con una solución de NaCl 0,85%, se cosecharon nuevamente por centrifugación durante 5 min a 5000 rpm y se resuspendieron en 0,5 ml de una solución de TE. Posteriormente se colocaron las muestras en un baño de agua a 100°C durante 15 min. Se utilizó 2 µl de la solución para reacciones de PCR de 25 µl de volumen final.

### **Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

La técnica se llevó a cabo siguiendo las indicaciones descritas por (Sambrook et al., 1989). Se emplearon geles horizontales de concentraciones de agarosa de 0,8%. Los geles se prepararon en solución reguladora TAE (40 mM Tris-acetato pH 8,0; 10 mM EDTA) con agregado de 1X de GelGreen (Biotium) y las separaciones electroforéticas se realizaron en la misma solución reguladora a una intensidad de corriente 100 mA, utilizando el sistema del tipo “submarino”. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con 0,1 volúmenes de solución de siembra (0,25% P/V de azul de bromofenol, 0,25% P/V de xilencianol, 30% P/V de glicerol preparada en agua estéril). Las bandas de ADN fueron visualizadas empleando un transiluminador de luz azul. Como marcadores de peso molecular se emplearon los fragmentos de ADN del fago λ obtenidos por digestión con la enzima de restricción EcoRI y HindIII (PBL Productos Biológicos).

### **Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa**

La purificación de ADN a partir de geles de agarosa se realizó empleando el equipo Gel Band Purification Kit provisto por Amersham (GE Healthcare Life Sciences) siguiendo las indicaciones del laboratorio fabricante.

### **Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Se siguieron las condiciones generales descritas por (Sambrook et al., 1989). Las composiciones de las soluciones y las condiciones de reacción, así como también información adicional, están disponibles en los manuales distribuidos por los laboratorios fabricantes de las enzimas de restricción.

### **Desfosforilación de ADN plasmídico linealizado**

Se realizó empleando fosfatasa alcalina de intestino de cordero (CIP), siguiendo las recomendaciones del laboratorio fabricante (Promega).

### **Ligación de los fragmentos de ADN**

La ligación de los fragmentos de ADN se realizó según el protocolo descrito por (Sambrook et al., 1989) en un medio de reacción conteniendo 0,5 mM de ATP, solución amortiguadora para T4 ADN ligasa y 1U de la enzima (Takara), en un volumen final de 20 µl. Las cantidades de cada uno de los fragmentos de ADN empleadas fueron de aproximadamente 50-100 ng y la reacción se llevó a cabo durante 16 hs a 4°C.

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Cada reacción de amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 o 50 µl, utilizando 20 pmoles de cada oligonucleótido y 20 ng de ADN molde. Se utilizó ADN polimerasa Taq o PFU siguiendo las indicaciones del proveedor (PBL, Productos BioLógicos).

## **Análisis de proteínas**

### **Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración protéica en extractos crudos fue determinada de acuerdo al método colorimétrico de Lowry (Lowry et al., 1951), utilizando una solución patrón de albúmina sérica bovina como proteína de referencia, cuya concentración fue determinada espectrofotométricamente.

### Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Las diferentes muestras protéicas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida realizados en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se siguió el sistema desarrollado por Laemmli (1970) por medio de la celda Mini-PROTEAN III de BioRad. Los geles se prepararon a una concentración de 15% y un espesor de 1,5mm. Fue preparado con 4% P/V de acrilamida en solución 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 1,8 mM EDTA y 0,1% P/V SDS y el gel de separación con acrilamida 15% P/V en solución 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 1,8 mM EDTA y 0,1 % P/V SDS. Las muestras se disociaron a 100°C durante 5 min. en presencia de 50 mM Tris-HCl pH 7,0, 0,5 mM ditioneitol (DTT), 4% V/V β-mercaptoetanol, 2% P/V SDS, 0,005% P/V de azul de bromofenol y 15% V/V de glicerol, antes de sembrar en el gel. Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente a una intensidad de corriente de 20 mA por gel en solución Tris Base 25 mM, glicina 192 mM (pH 8,3), 1 mM EDTA y 0,1% P/V SDS. Una vez finalizada la electroforesis los geles se destinaron a ensayos de Western Blot o se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 durante 30 min y se destiñeron con acético-etanol-agua (1:3:7) o por ebullición durante 15 min en agua destilada.

### Detección de proteínas en geles de poliacrilamida mediante ensayos de Western blot

Se sembraron 60ug de proteínas por muestra para realizar un SDS-Page como se describió previamente. Posteriormente, se realizó la electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell BA85, 0,45 µm), utilizando la celda Mini trans-blot electrophoretic transfer (Bio-Rad, USA). La transferencia e hibridación se realizaron según el protocolo descrito por (Sambrook et al., 1989)). Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-CitO y anti-oadA de *E. faecalis*. Ambos se incubaron en una dilución 1/500 y 1/1000 con la membrana, respectivamente. Los complejos proteína-anticuerpos fueron visualizados usando anticuerpos anti-IgG (H+L)-AP de conejo (conjugados con fosfatasa alcalina) de Bio-Rad diluidos 1:3000, NBT 0,33 mg/ml (ICN) y BCIP 0,17 mg/ml (Sigma-Aldrich).

Por otro lado las membranas también se incubaron con Neutravidina conjugada a fosfatasa alcalina (Invitrogen) y se procedió a revelar en las mismas condiciones descriptas anteriormente.



## Determinación de la producción de aroma

### Pruebas de Voges-Proskauer

La producción de diacetilo y acetoína fue determinada por las pruebas de Voges Proskauer (VP) cualitativa y cuantitativa. Para la primera, a cultivos incubados por 5 h se les determinó la presencia conjunta de diacetilo y acetoína en los sobrenadantes (SN) de la siguiente manera: 1 ml de SN se mezcló con 0,6 ml de  $\alpha$ -naftol 5% P/V de etanol 96% y 0,2 ml de hidróxido de potasio 40% P/V. La acetoína presente en cada SN se oxida en las condiciones de la prueba para formar diacetilo. El diacetilo total (formado y preexistente) reacciona con la peptona del LB para producir color. Se considera una reacción positiva a la formación de color rojizo. Para la prueba de VP cuantitativa (adaptada del método de Barry y Feeney (1967) se midieron las concentraciones de diacetilo y acetoína producidas en sobrenadantes de Resting Cells (RC) de cada cepa y condición probada. Las RC se prepararon como se detalla a continuación. Se centrifugaron las células crecidas como se detalló anteriormente, por 15 min a 4500 rpm y 4 °C. Los pellets se lavaron dos veces en Kpi 50 mM pH 5,8, y finalmente resuspendidos en la misma solución a pH 7.0 o 5.8 en un volumen total de 1,5 ml a una  $DO_{600}$  final de 1,5. Las RC obtenidas fueron incubadas con citrato (15 mM), piruvato (100 mM), glucosa (30 mM) y/o ribosa (30 mM) a 37 °C sin agitación por 60 min. Los sobrenadantes de cada cultivo (175  $\mu$ l) se transfirieron a microplacas de 96 pocillos, a los cuales se le adicionó 25  $\mu$ l de solución A fresca (15% P/V de  $\alpha$ -naftol y 0.5% P/V de creatina en 7,5 M de NaOH). Luego de 10 min de incubación, la placa fue cargada en el lector PowerWave XS (BioTek) y la  $A_{540}$  fue registrada. La concentración de diacetilo y acetoína (oxidada a diacetilo en las condiciones de medición) conjunta se calcularon usando una curva de calibración de diacetilo. Los resultados se presentan como los promedios y los desvíos estándar de ensayos realizados por triplicado.

## Ensayos específicos

### Determinación de la producción de tiramina

La actividad descarboxilasa se midió utilizando un medio sólido en paca de petri. Se utilizó una modificación de la composición descrita en Bover-Cid y Holzapfel (1999). Se preparó un medio sólido con tripotona 5,0 g/l, extracto levadura 5,0 g/l, extracto de carne 5,0 g/l, NaCl 2,5 g/l, glucosa 0,5 g/l, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0 g/l, CaCO<sub>3</sub> 0,1 g/l, púrpura de bromocresol 0,06 g/l y agar 2%. Se ajustó el a pH 5,3 y cuando se prepararon las placas se incorporó al medio fundido tirosina sólida para una concentración final de 10,0 g/l. Las cepas se incubaron a 37°C por 48h. El medio adopta una coloración amarilla que vira a violeta en caso de alcalinización producto de la descarboxilación del aminoácido.

### Determinación de la actividad proteasa

Se ensayó la capacidad de hidrolizar caseínas en placas de LB y leche (20 ml leche descremada en polvo reconstituída al 10% P/V en 80 ml de medio LB sólido). Se repicaron las cepas en estudio en estas placas y se dejaron a 37°C por 72h. La hidrólisis de las proteínas de la leche se evidencia por la aparición de zonas claras alrededor de las estrías.

### Determinación de la actividad esterasa

Se prepararon placas de medio LB sólido suplementadas con tributirina 1% y rhodamina 0.001%, de acuerdo a Kouker y Jaeger (1987). Se inocularon las cepas en estudio y una cepa control positivo de *Serratia marcescens* 66262. Se permitió crecer a 37°C por 12 y 48 horas. La actividad esterasa se evidenció por la presencia de fluorescencia color anaranjada luego de irradiar las placas con UV. Las cepas que no hidrolizan la tributirina acumulan rhodamina, no muestran fluorescencia naranja y forman colonias rosadas.

### Transporte de citrato radiactivo

Se crecieron los cultivos bacterianos en medio LBG o LBC hasta una  $DO_{600}$  de 0,6. Se cosecharon las células por centrifugación, se lavaron en solución Kpi 50 mM, pH 5,8. Se resuspendieron los cultivos hasta una  $DO_{600}$  de 10 y se almacenaron en hielo hasta su utilización. Los ensayos de transporte se realizaron por periodos de 10 minutos con 688 pM [1, 5- $^{14}C$ ] citrato (109 mCi/mmol) a 30 °C. Luego, a una dilución de las células de  $DO_{600}$  de 3 se le adicionó [ $^{14}C$ ] citrato y se realizaron las mediciones como se describe en (Blancato et al., 2006).

### Consumo de citrato por medidas de fluorescencia

Los valores de pH intracelular fueron obtenidos utilizando la sonda 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-( $\gamma$ -6)-carboxifluoresceína (BCECF). Al disminuir la acidez, la sonda cambia su estado y produce un incremento de la intensidad de fluorescencia emitida a 525 nm.

Se prepararon RC de las cepas en estudio crecidas en las condiciones establecidas para cada experimento. Luego, se procedió a cargar las células con la sonda fluorescente. Para ello, se añadió 1  $\mu$ l de solución de BCECF 10 mM a la suspensión de células lavadas y resuspendidas en 1 ml de Kpi con 2.5  $\mu$ l de HCl 0,5 N. Se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, luego de los cuales se agregó 1 ml de Kpi. Finalmente las células fueron lavadas dos veces y resuspendidas en 150 - 200  $\mu$ l.

Para cada experimento, las células cargadas con BCECF fueron suspendidas en 3 mL de buffer Kpi 50 mM con el pH ajustado al valor necesario para cada experimento. La suspensión se introdujo en una cubeta de cuarzo de 3 mL (1 cm de paso óptico) equilibrada a 30° C. Las muestras fueron agitadas usando una barra de agitación magnética y la señal de fluorescencia fue monitoreada cada 0,02 segundos en un espectrofluorómetro (Perkin Elmer LS 55). Durante la medición se adicionó citrato 15 mM o glucosa 30 mM. La longitud de onda de la excitación fue de 503 nm. Los valores de pH citoplasmáticos y externos fueron equilibrados al finalizar cada experimento mediante el agregado de 1 mM valinomicina, 1 mM nigericina y 2% v/v Triton X-100. Las curvas de calibración fueron determinadas en Kpi 50 mM valores de pH entre 3.0 y 11.0. El pH fue ajustado con NaOH o HCl. Los valores de las curvas de calibración fueron

procesados mediante un ajuste no lineal de 4 parámetros. Dichos parámetros se obtienen de acuerdo a la siguiente expresión:

$$f(x) = \{(a - d) / [1 + (x/c)^b]\} + d$$

Donde  $a$  y  $d$  son los valores asintóticos máximos y mínimos (los valores de fluorescencia máximo y mínimo),  $c$  el punto de inflexión ( $pK_a$  de BCECF) y  $b$  la pendiente. Los valores de pH para las curvas de intensidad de fluorescencia en función del tiempo se ajustaron para cada curva a partir de la siguiente expresión:

$$pH = pK_{aBCECF} + \log (I_f/I_{f_{max}} - I_{f_{min}}/I_{f_{max}}) - \log (1 - I_f/I_{f_{max}})$$

Donde  $pK_{aBCECF}$ ,  $I_{f_{min}}$  e  $I_{f_{max}}$  corresponden a los valores obtenidos para las curvas de titulación para BCECF mientras que  $I_f$  es la variable que fue medida en función del tiempo.

### Cuantificación de la formación de biofilm

El biofilm formado por células de *Enterococcus* fue cuantificado de la siguiente manera. Se realizaron cultivos en medio LBG o LBC en placas de poliestireno de 96 pocillos (Cellstar). Los mismos se incubaron a 37° C durante 48 h y se realizó una medición de la  $A_{660}$  final con el lector de microplacas PowerWave XS (Biotek). Las bacterias no adheridas se removieron lavando los pocillos con agua. Las células adheridas se fijaron a 60° C durante 20 min. y se tiñeron con 100 µl de cristal violeta (0,3 % p/v en metanol-agua 30,0 % v/v) durante 15 min. Luego, los pocillos se lavaron extensivamente con agua para remover el exceso de colorante. Finalmente, el colorante unido a las bacterias fue liberado por adición de etanol-acetona (80:20) y se determinaron los valores de absorbancia a 550 nm. El cálculo del cociente  $A_{550}/A_{660}$  permitió cuantificar los niveles de biofilm producidos por cada cepa. Los datos se expresan como el valor medio de este cociente y su desviación estándar, a partir de un experimento realizado por quintuplicado.

### Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Las resistencias a antibióticos fueron ensayadas con el método de difusión por disco. El servicio fue provisto por el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI) CONICET y el Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. También se realizaron

ensayos automatizados utilizando el analizador Vitek®2 en colaboración con Eduardo Gregorini del Laboratorio de Microbiología del Hospital Escuela Eva Perón (FBioyF – UNR). Todos los ensayos y las concentraciones inhibitorias mínimas fueron de acuerdo a las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI, 2016).

#### **Estimación del consumo de citrato por células en reposo por cromatografía en fase líquida de alto rendimiento (HPLC)**

Se prepararon RC de las células a estudiar a pH 5,8 y se incubaron a 37 °C durante 1 hora sin agitación. El ensayo se realizó en un volumen total de 1,5 ml. A tiempo cero se adicionó o no citrato a una concentración de 15 mM. Se tomaron alícuotas de este tiempo que fueron inmediatamente centrifugadas durante 1 min a velocidad máxima en una centrífuga de mesa. El sobrenadante se almacenó en hielo hasta su posterior análisis. Del mismo modo se tomaron y trataron a muestras para tiempo final ( $t = 2$  h). Una alícuota de 10  $\mu$ l del sobrenadante se cargó en una columna Aminex HPX-87H de intercambio aniónico (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA) operando a 30 °C en modo isocrático utilizando  $H_2SO_4$  5 mM como fase móvil y una velocidad de flujo de 0,8 ml/min. Los picos se identificaron por medio de la utilización de patrones calibración construidas por inyección de estándares.

#### **Determinación de consumo de azúcares**

El patrón fermentativo de azúcares fue determinado con el equipo comercial API 50 CH kit (bioMérieux, Francia), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### **Recuento de UFC en sangre y orina**

Se inocularon 400  $\mu$ l de LBG a DO inicial de 0.1 con las cepas en estudio. Se incubaron a 37°C por una hora. Luego se centrifugaron a máxima velocidad por un minuto, se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendió el pellet en 400  $\mu$ l de sangre de rata desfibrinada u orina humana. Se tomaron alícuotas a tiempo 0h, 2h, 4h, 6h y 24h, y se plaquearon diluciones, para su posterior recuento. Se realizaron dos replicas por cepa y se plaquearon las alícuotas por triplicado.

### Lisis de glóbulos rojos

Para la visualización de las células fluorescentes de *E. faecalis* en sangre de rata se procedió a lisis los glóbulos rojos previamente a la toma de la muestra de acuerdo al siguiente protocolo (McCoy, 2001). Brevemente, se diluyeron 40 µl de sangre en 560 µl de buffer de lisis (155mM de NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM de KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM de EDTA, pH 7.4), se incubaron a temperatura ambiente 5 minutos, se centrifugaron a 300 g 5 minutos a temperatura ambiente, para finalmente resuspender el precipitado en 40 µl de PBS.

### Ensayos en *Galleria mellonella*

#### Inoculaciones y ensayos de supervivencia

Los ensayos de supervivencia de *G. mellonella* se realizaron usando 16 larvas por grupo. Éstas fueron seleccionadas por su peso, variable entre 0,18 y 0,35 g, e incubadas toda una noche a 30°C sin alimento. Cada grupo fue inoculado con suspensiones bacterianas realizadas en solución tampón PBS 1x de las cepas en estudio a los valores de UFC/ larva mencionados en el texto. Los inóculos se prepararon a una concentración fija, determinada por recuento en placa, en buffer PBS 1X y glicerol 10%, congelados y luego diluidos para obtener la concentración necesaria a inocular. El sitio de inoculación elegido fue la última propata izquierda.

Para las curvas de supervivencia, el estado de las larvas fue controlado cada 2 a 4 hs. Luego de 72 horas, se construyeron las curvas de Kaplan-Meier utilizando el software SigmaPlot 12 y aplicando los test de LogRank (Rich et al., 2010) y Holm-Sidak, en el caso de ser necesarias comparaciones múltiple. El valor de P se fijó en 0.05.

#### Recuentos de UFC in vivo

Se inocularon grupos de 45 larvas por cepa a estudiar. Se inyectó un total de  $9 \times 10^6$  UFC/larva. A 0, 24 y 48 horas post-inoculación se extrajo hemolinfa de 5 individuos y se realizaron pools diluyendo al medio en buffer IPS frío. Se adicionaron 3 µl de Triton X-100 0.2% en PBS estéril cada 20ul de pool. Se mezcló con vortex a velocidad media por 5 segundos y se incubó a temperatura ambiente 15 segundos. A continuación, la hemolinfa se diluyó en PBS y se plaqueó en LBG 0.5% para el recuento

el día posterior. El tiempo 0h de extracción corresponde a 30 min post-inoculación. El experimento se realizó por duplicado, con tres replicas técnicas por tiempo.

#### **Extracción de hemolinfa y hemocitos**

Se separaron las larvas necesarias para cada experimento y se colocaron dentro de tubos plásticos de 1,5 ml en hielo. Al cabo de 15 minutos, la pérdida de movilidad de los individuos comienza a evidenciarse. Sobre una placa de Petri nueva, se coloca una larva limpia (frotada en etanol 70%) y se realiza un corte sobre una propata con una hoja de bisturí esterilizada. En el caso de larvas que hayan sido inoculadas previamente, el corte se realizó sobre el sitio de inyección. En el caso de larvas que no fueron inoculadas, se realizó el corte sobre la primera propata izquierda, para evitar la disrupción del intestino.

Para la extracción de hemocitos, se realizaron pools de 100  $\mu$ l de hemolinfa, extrayendo 20  $\mu$ l por individuo; se diluyeron 1/100 en bufer IPS frío. Se centrifugaron a 700g y lavaron dos veces con IPS, para finalmente resuspender las células en buffer PBS 1X con glucosa 5mM,  $MgCl_2$  1 mM y  $CaCl_2$  0,5mM.

#### **Microscopía de fluorescencia con hemolinfa**

A las larvas inoculadas con la cepa de interés se les realizó una extracción de hemocitos como se detalló en el párrafo anterior. Estos últimos, se fijaron con formaldehído y se observaron en microscopio de fluorescencia (Nikon E600) con un aumento de 60x, las imágenes se adquirieron con la cámara adaptada Nikon DXM1200 y el programa ACT-1. Las fotos fueron coloreadas y superpuestas por medio del programa Fiji (Schindelin et al., 2012).

#### **Análisis estadísticos**

A excepción de lo descripto para las curvas de supervivencia previamente, los análisis estadísticos llevados a cabo en esta tesis son de tipo unifactorial o bifactorial de la variancia (según los datos comparados), aplicando el test de Bonferroni para las comparaciones múltiples, y fijando el valor de P en 0,05. Se utilizó en todos los casos el software SigmaPlot 12.

## Métodos bioinformáticos

### Obtención, ensamblado y anotación de datos genómicos

Los genomas de las cepas aisladas de quesos fueron secuenciados utilizando la tecnología Illumina. En nuestro caso se realizó el ensamblado de novo de las lecturas obtenidas utilizando el software de ensamblado de secuencia SeqMan Ngen de la compañía DNASTAR. Posteriormente fueron depositados en Rast y cargados en las bases de datos online a través de NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Como metodología de depuración de redundancia de los cóntigos resultantes se realizó el alineamiento entre ellos (todos contra todos) con la aplicación blastn y aquellos cóntigos que poseyeran menos de 1.000 pb y con una similitud superior al 99% con secuencias ya contenidas en un cóntigo de mayor tamaño fueron eliminados (Repizo et al., 2014).

El programa en su versión 2.3.1 se ejecutó de manera local invocándolo a través de línea de comandos en una terminal de Linux. La sintaxis utilizada fue la siguiente:

```
> makeblastdb -in archivo.fasta -dbtype nucl
> blastn -evaluate 1e-10 -ungapped -query archivo.fasta -db archivo.fasta -outfmt
"7 qacc sacc %identity alignment length qstart qend sstart send" -out listado.txt
```

Todos los genomas utilizados se encuentran disponibles en la base de datos GenBank (Benson et al., 2013), RefSeq (Tatusova et al., 2014) o disponibles a través del sitio web EZBioCloud ([www.ezbiocloud.net](http://www.ezbiocloud.net)). La anotación de los genoma se llevó a cabo con RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology; (Overbeek et al., 2014).

### Análisis filogenómicos

La historia evolutiva de las cepas fue construida usando Gegenees (Ågren et al., 2012) o por medio de un a Multi Locus Sequence Analysis (MLSA) como se describe previamente en Espariz y colaboradores (2016). Para ello, se seleccionaron los genomas de las cuatro cepas en estudio (GM70, GM75, IQ23 e IQ110) así como los de 33 enterococos más. El análisis por medio de Gegenees se llevó a cabo usando una comparación fragmentada todos versus todos, con un fragmento de tamaño de 200 pb y un paso de 100 pb. Los datos resultantes se analizaron con el software Splitstree (Huson y Bryant, 2006) . El MLSA se realizó con 33 genes core definidos por el mayor hit



bidireccional en búsquedas de BLAST con un valor de  $e$  de  $1 \times 10^{-30}$ . Éstos fueron individualmente alineados con clustalW, concatenados con el script de Perl catfasta2phyml.pl y limpiados usando Gblock 0.91b (Castresana, 2000). El árbol con el mejor modelo de sustitución y con mayor log(likelihood) fue seleccionado y construido con Mega5 (Tamura et al., 2011). La fiabilidad del árbol inferido se probó con un bootstrap de 1000.

Los valores de ANI se calcularon según Repizo y colaboradores (2014), utilizando el software JSpecies con el algoritmo de BLAST (Richter y Rossello-Mora, 2009). Las estimaciones de los valores de porcentajes de hibridación DNA-DNA in silico (*isDDH*) se hicieron con el servidor web Genome Blast Distance Phylogeny (GBDP) 2.0 (<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>) y se utilizó la fórmula de secuencia completa descrita en Meier-Kolthoff y colaboradores (2013).

### **Secuencias de inserción (IS), profagos, CRISPRs e islas genómicas (GEIs)**

Se buscaron las IS presentes en los genomas por medio de la herramienta de búsqueda de la plataforma ISfinder (Siguier et al., 2006) y la base de datos disponible en <http://www-is.biotoul.fr>. IS con valores de  $e$  de 0.0 o menores fueron seleccionadas y manualmente localizadas en los genomas por medio de búsquedas con Blast a través de Rast. Los profagos putativos se buscaron con la aplicación Phaster (Arndt et al., 2016). Las islas genómicas fueron predichas con Island Viewer 3 (Dhillon et al., 2015). La secuencias CRISPR y los genes codificantes de proteínas Cas fueron explorados con la herramienta CRISPRFinder (Grissa et al., 2007) y con RAST.

### **Resistencias antibióticas, factores de virulencia y funciones metabólicas**

Se Utilizaron las herramientas ResFinder (Kleinheinz et al., 2014), CARD (Jia et al., 2017) y RAST para la identificación de genes de resistencia antibióticas.

Las herramientas Virulence finder (Kleinheinz et al., 2014) y Pathogen Finder (Cosentino et al., 2013) se usaron para predecir factores de virulencia comunes en bacterias Gram-positivas y patogenicia, respectivamente.

Los genes responsables de metabolismos específicos o con funciones relevantes para los temas en estudio se localizaron utilizando Rast y Blast de manera manual.

Los grupos ST fueron calculados utilizando herramienta MLST 1.8 (Larsen et al., 2012)

## Resultados y discusión

## Resultados capítulo I

Activación del metabolismo de citrato en *Enterococcus faecalis* durante la infección en *Galleria mellonella*

En nuestro laboratorio se han estudiado extensamente los mecanismos moleculares regulatorios que controlan la expresión de los genes involucrados en la fermentación de citrato y la producción de diacetilo en *Enterococcus faecalis* (Blancato et al., 2008, 2016, Repizo et al., 2011, 2013; Suárez et al., 2011a).

Aunque muchas de las cepas de *E. faecalis* son reconocidas como patógenas oportunistas, la relación entre esta ruta metabólica y la virulencia de las cepas no fue estudiada previamente en profundidad.

Para iniciar este trabajo de tesis, nos planteamos investigar la relación existente entre la capacidad de la cepa *E. faecalis* JH2-2 de utilizar citrato y el proceso infectivo llevado a cabo por la cepa, utilizando el modelo animal alternativo *Galleria mellonella*.

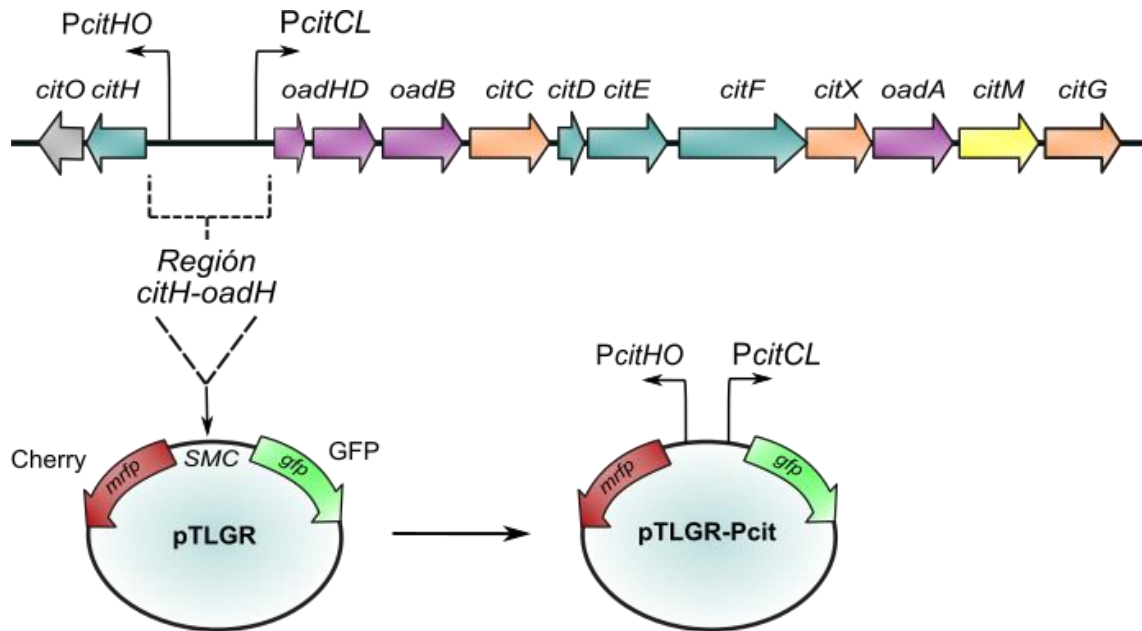
La cepa elegida constituye un modelo experimental de laboratorio, originalmente aislada de clínica (Jacob y Hobbs, 1974), y en estudios preliminares ha demostrado provocar la muerte de *G. mellonella* (Repizo et al., 2014). Al mismo tiempo, *E. faecalis* JH2-2 nos permite su modificación genética.

### **Análisis de la expresión de los genes *cit* utilizando técnicas fluorescentes**

Para comenzar, amplificamos la región intergénica *citH-oadH*, del grupo de genes involucrado en el transporte y la degradación de citrato de la cepa *E. faecalis* JH2-2. Esta región dirige la expresión de los dos operones divergentes que contienen los genes *cit* (Blancato et al., 2008). Por un lado, permite la expresión de regulador transcripcional CitO y del transportador de citrato, mientras que por otro, de todas las enzimas necesarias para la fermentación de citrato.

La región *citH-oadH* fue clonada en el vector reportero fluorescente pTLGR (García-Cayuela et al., 2012), generando la construcción pTLGR-Pcit (Fig. 13). Brevemente, este plásmido posee los genes codificantes de las proteínas fluorescentes GFP (del inglés “green fluorescent protein”; excitación a 488 nm y emisión a 511 nm; fluoresce en color verde) y Cherry (excitación a 587 nm y emisión a 612 nm; fluoresce en color rojo) y entre ellos el sitio de múltiple clonado, lo que permite incorporar regiones regulatorias para que dirijan la expresión de uno o ambos genes reporteros. En nuestro caso, la construcción nos permitió observar de manera indirecta la expresión

del operón *citHO* a través de la fluorescencia de Cherry por medio del promotor *PcitHO* y la del operón *oadH-citG* a través de GFP por medio del promotor *PcitCL* (Fig. 13).



**Fig. 13. Construcción del plásmido pTLGR-Pcit.** Se muestra el grupo de genes *cit*, se indican los dos promotores presentes en la región intergénica *citH-oadH* y la construcción terminada, con GFP bajo la regulación del promotor *PcitCL* y Cherry de *PcitHO*.

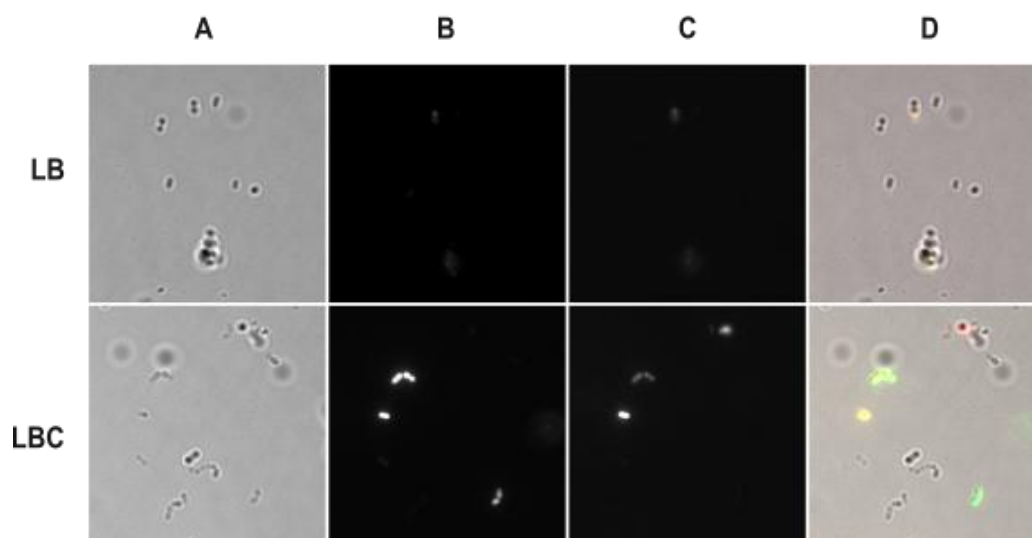
A continuación, el plásmido vacío pTLGR y el pTLGR-Pcit fueron electroporados en la cepa *E. faecalis* JH2-2, obteniéndose las cepas JH-pTLGR-Pcit y JH-pTLGR, respectivamente. Para confirmar la expresión de los genes reporteros a partir de los promotores clonados crecimos las cepas en medio LB y LB suplementado con citrato 2mM (LBC) y utilizamos microscopía de fluorescencia para observar las células.

Como se puede ver en la Fig. 14, luego de 16 horas de incubación a 37°C, en ausencia de citrato solo se obtiene una fluorescencia tenue que podría deberse a niveles de expresión basal de los promotores (Blancato et al, 2008). Sin embargo, cuando los enterococos son crecidos en medio LBC, la gran mayoría de las células muestran fluorescencia tanto de Cherry como de GFP.

Es importante destacar que, en la cepa JH2-2, la expresión de los operones cromosómicos *oadH-citG* y *citHO* dependen del activador CitO, codificado en el operón *citHO*. El plásmido reportero fue introducido en la cepa JH2-2 que porta en sí misma los genes *cit*. Por lo tanto, la expresión observada de Cherry y GFP es consecuencia de la inducción del sistema cromosómico, por la presencia de citrato en el medio.

Estos resultados indican que la construcción realizada permite el análisis de la inducción de los promotores *PcitHO* y *PcitCL*. La fluorescencia de ambas proteínas, expresadas por medio de las regiones promotoras introducidas en el vector, es detectada en presencia de citrato, que es el compuesto inductor de dichos operones (Blancato et al., 2016, 2008; Fig. 14).

Por otro lado, la cepa transformada con el plásmido vacío no mostró señales de fluorescencia (no mostrado).



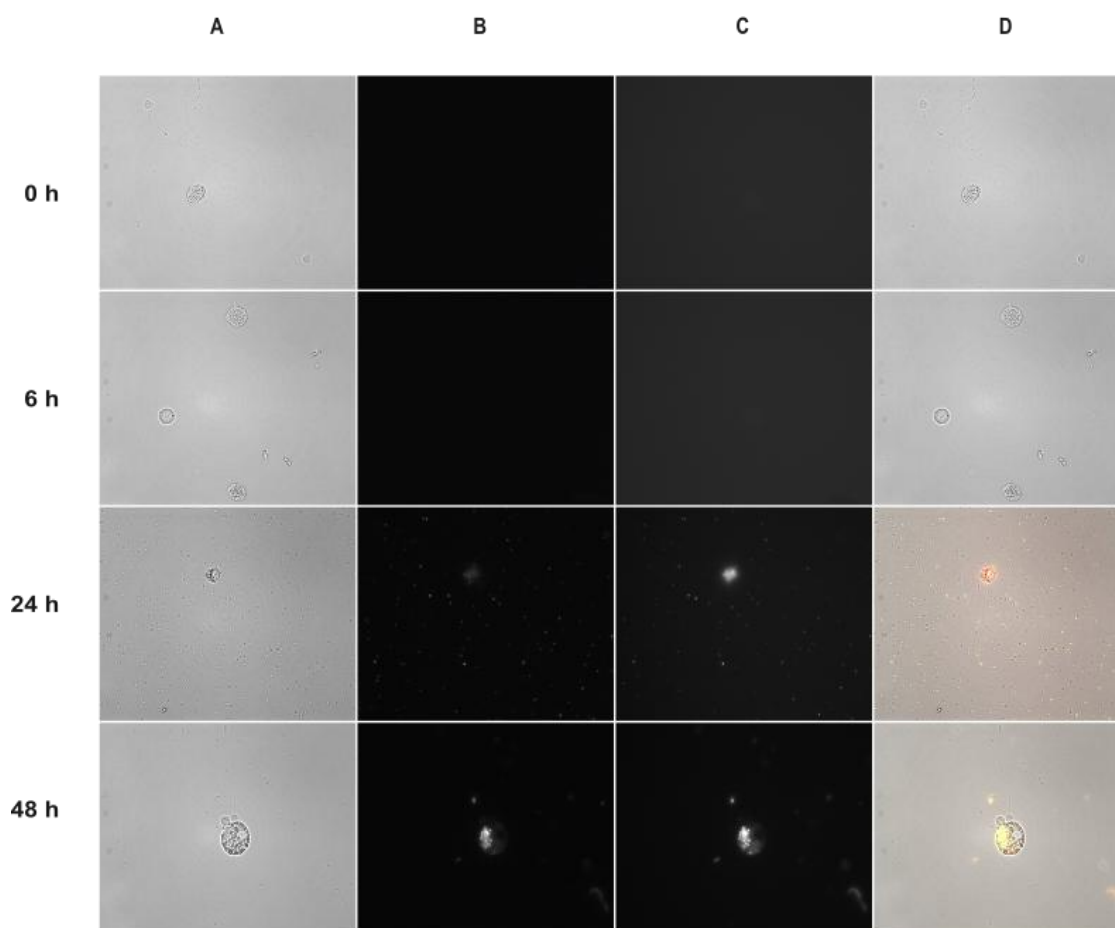
**Fig. 14. Inducción de los genes reporteros por medio de los promotores cit.** Fluorescencia detectada luego de 16 horas de crecimiento de la cepa *E. faecalis* JH-pTLGR-PCit en medio LB y LB suplementado con citrato 2mM (LBC). A) Microscopía óptica; B) microscopía de fluorescencia en verde (GFP); C) microscopía de fluorescencia en rojo (Cherry); D) superposición de A, B y C. Aumento 60x.

### Expresión de los genes *cit* durante el proceso de infección en *G. mellonella*

A continuación, analizamos la expresión de los genes *cit* durante el proceso de infección llevado a cabo por la cepa *E. faecalis* JH2-2 en el insecto modelo *G. mellonella*.

Para ello, preparamos suspensiones bacterianas en solución PBS 1X y glicerol 10%. Estas suspensiones fueron congeladas y el número de UFC/ml de las mismas fue determinado por recuento en placa. Realizamos inoculaciones con diluciones de dicha suspensión a grupos de 16 larvas por condición experimental, a través de inyecciones directas a hemolinfa de cada individuo.

Inicialmente, inoculamos la cepa JH-pTLGR-Pcit, de modo tal que se inyectaran  $9 \times 10^6$  UFC a cada larva. Luego, extrajimos la hemolinfa de las mismas, tal como se describe en materiales y métodos, a diferentes tiempos post inoculación. Por medio de microscopía detectamos la fluorescencia en cada extracto.



**Fig. 15. Inducción de los genes reporteros en la hemolinfa de *G. mellonella*.** Se inoculó la cepa JH-pTLGR-Pcit a  $9 \times 10^6$  UFC/larva. Luego de 0, 6, 24 y 48 horas se extrajeron muestras de hemolinfa de los individuos infectados y se detectó fluorescencia por microscopía. A) Microscopía óptica; B) microscopía de fluorescencia en verde (GFP); C) microscopía de fluorescencia en rojo (Cherry); D) superposición de A, B y C. Aumento 60x.

Luego de 24 horas, pudimos observar fluorescencia de los genes reporteros, tanto en las bacterias libres en la hemolinfa como en las asociadas a los hemocitos (Fig. 15). Durante este período de tiempo, evidenciamos el aumento en la melanización de las larvas infectadas (síntoma de lisis celular e infección activa, (Lackie, 1988) y el deterioro general en el estado de salud de los individuos (pérdida de motilidad y de fluidos).



Estos resultados subrayan la importancia de la elección de *G. mellonella* como modelo para estos estudios. Dado que los promotores de los genes *cit* se encienden en la hemolinfa del insecto, induciendo la expresión de los reporteros, se deduce que los genes *cit* también se expresarían en este animal. Asimismo, los resultados indicarían acerca de la presencia de citrato en la hemolinfa de este insecto (Wyatt, 1961).

Además, las inoculaciones con la cepa JH2-2 afectan significativamente el estado fisiológico general de los individuos. El deterioro progresivo provocado conduce a la muerte de gran parte de los individuos inyectados. Por lo tanto, *G. mellonella*, nos permite realizar un análisis aproximativo a la relación entre la activación de los genes *cit* y el progreso de la infección.

### **Importancia de la fermentación de citrato en la virulencia de *E. faecalis* JH2-2 en *G. mellonella***

Considerando los resultados anteriores, comparamos los efectos de las inoculaciones con la cepa *E. faecalis* JH2-2 con los de cepas mutantes en los genes del metabolismo de citrato (construidas previamente en el laboratorio a partir de la cepa JH2-2), utilizando *G. mellonella* en ensayos de supervivencia. Luego, los resultados fueron analizados por medio de curvas de Kaplan-Meier, según se detalla en la introducción de esta tesis (K-M; Kaplan y Meier, 1958).

Brevemente, los ensayos de supervivencia implican el monitoreo de cada individuo inoculado por 72 horas luego de realizar la inoculación. Dicho seguimiento contempla el registro de las horas a las que se producen las muertes, para luego, con esos datos, construir curvas que serán comparadas estadísticamente entre sí (ver detalle en Introducción).

La Fig. 16 muestra los resultados de estos ensayos luego de realizar inoculaciones de  $4 \times 10^7$  y  $6 \times 10^7$  UFC/larva con la cepa *E. faecalis* JH2-2. La primer larva muerta, en cada caso, la encontramos a las 20 y 24 primeras horas, respectivamente. Luego de 48 de infección, la supervivencia se redujo considerablemente a un 40% y un 10% para el inóculo de menor y el de mayor concentración, respectivamente (Fig. 16).

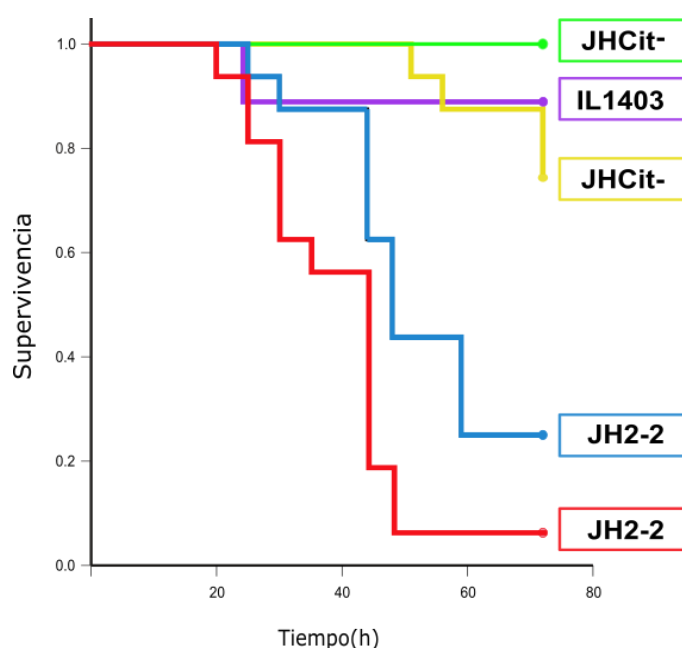
Utilizamos como control la cepa inocua *L. lactis* IL1403 a  $4 \times 10^7$  UFC/larva. La curva obtenida para esta cepa difiere significativamente de la obtenida para el mismo

valor de UFC inoculado de *E. faecalis* JH2-2 ( $P<0,05$ ). Como se observa en la Fig. 16, para esta cepa, y al cabo de 72 horas, se obtiene una supervivencia elevada del 90%.

Al mismo tiempo, se inoculó un grupo de larvas con la solución de PBS libre de bacterias, lo cual no produjo ninguna muerte (no mostrado).

A continuación, realizamos inoculaciones con la cepa *E. faecalis* JHCit<sup>-</sup>. Esta cepa posee una inserción que interrumpe el gen *oadD*, y por ende impide la correcta expresión del operón *oadH-citG*. Como consecuencia, la cepa JHCit<sup>-</sup> es incapaz de crecer utilizando citrato como fuente de carbono de manera satisfactoria. Evaluamos la virulencia de esta cepa inoculándola a las mismas concentraciones que la cepa JH2-2 (WT) (Fig. 16).

A pesar de los bajos niveles de supervivencia obtenidos con la cepa JH2-2, la cepa JHCit<sup>-</sup> inyectada a  $4 \times 10^7$  UFC/larva fue incapaz de producir muertes en las 72 horas de duración del ensayo. Aún realizando inoculaciones con  $6 \times 10^7$  UFC/larva, dicha cepa resultó significativamente menos virulenta ( $p<0,001$ ) que la cepa WT en *G. mellonella*, demostrando un fenotipo similar al de la cepa *L. lactis* IL1403.



**Fig. 16. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para las cepas JH2-2 y JHCit<sup>-</sup>.** Se inocularon larvas de *G. mellonella* con *E. faecalis* JH2-2 a  $4 \times 10^7$  (azul) y  $6 \times 10^7$  (rojo) UFC/larva y *E. faecalis* JHCit<sup>-</sup> a  $4 \times 10^7$  (verde)  $6 \times 10^7$  (amarillo) UFC/larva. Se utilizó la cepa *L. lactis* IL1403 a  $4 \times 10^7$  (violeta) UFC/larva como control.

En base a los resultados obtenidos decidimos continuar estudiando diferentes mutantes en el metabolismo de citrato.

Nos enfocamos en los genes *oad*, que conforman una bomba de  $\text{Na}^+$  responsable de la descarboxilación del oxaloacetato (primer paso en la ruta catabólica de citrato). Estas bombas de  $\text{Na}^+$  asociadas al metabolismo de citrato, han sido descritas previamente en cepas patogénicas de *K. pneumoniae* y *Vibrio cholerae* (Dimroth y Thomer, 1993; Dimroth et al., 2001; Inoue y Li, 2015).

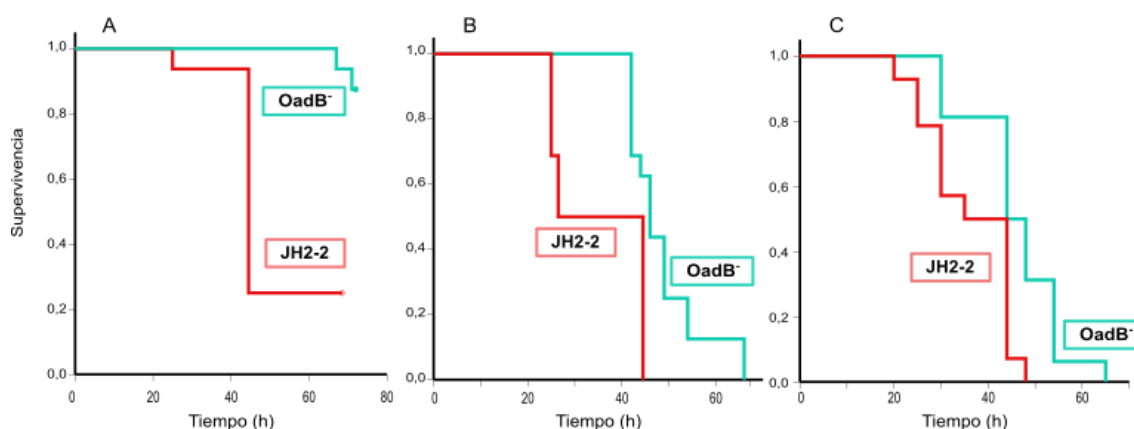
Las eliminaciones de los genes *oadA* y *oadB* de la cepa JH2-2 (Repizo et al., 2013), genes que codifican a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la enzima OAD respectivamente, generan nuevas cepas defectuosas en el uso de citrato. Así, la cepa JH2-2-OadA<sup>-</sup> (carente del gen *oadA*, subunidad citosólica) es solo capaz de degradar citrato hasta oxaloacetato, y por consiguiente no muestra una capacidad de crecimiento diferente en presencia de citrato. En contraposición, la cepa JH2-2-OadB<sup>-</sup> (carente de la subunidad de membrana) puede convertir citrato hasta piruvato gracias a la acción del complejo citosólico OadAHD (Repizo et al., 2013). A diferencia de lo que sucede con la mutante en el gen *oadA*, esta cepa en medio LB suplementado con citrato es capaz de alcanzar los mismos valores de DO<sub>600</sub> que la cepa parental, pero presenta una fase de latencia mayor (Repizo et al., 2013).

De este modo, realizamos inoculaciones con ambas mutantes y controlamos la supervivencia de las larvas de *G. mellonella* para analizar el aporte del complejo OAD en la virulencia de *E. faecalis* y complementar los resultados previos.

Considerando que la mortalidad larval se ve influenciada por la concentración del inóculo, inyectamos diferentes valores de UFC/larva y determinamos las posibles diferencias.

Evaluamos la virulencia de la mutante JH2-2-OadB<sup>-</sup> en un rango de concentraciones que oscila entre  $1 \times 10^7$  y  $5 \times 10^7$  UFC/larva (Fig. 17), y comparamos estadísticamente las curvas obtenidas con las equivalentes de la cepa WT a las mismas concentraciones. La cepa JH2-2-OadB<sup>-</sup> resultó menos virulenta que la WT cuando se la inoculó con valores de UFC de  $1 \times 10^7$  y  $3 \times 10^7$  ( $P < 0.006$ ), permitiendo más del 68% de supervivencia (vs menos de 44% para la WT) para el menor de los inóculos. Aunque para el inóculo de  $3 \times 10^7$  UFC/larva los resultados no son tan evidentes, el análisis estadístico de K-M permite establecer que la curva de la mutante JH2-2-OadB<sup>-</sup> es significativamente diferente y, de acuerdo a los datos, menor que la curva para la cepa WT a la misma concentración ( $P = 0.001$ ).

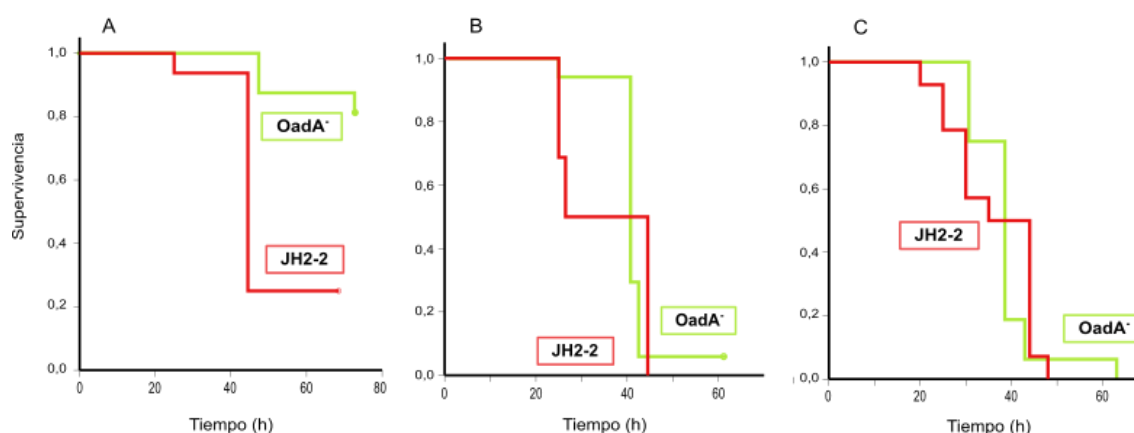
Por el contrario, a  $5,8 \times 10^7$  UFC/larva, la cepa JH2-2-OadB<sup>-</sup> no se comporta diferente de la cepa *E. faecalis* JH2-2 a  $5,3 \times 10^7$  UFC/larva (Fig. 17) ( $P > 0,05$ ).



**Fig. 17. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para la mutante JH2-2-OadB<sup>-</sup>.** Se inocularon larvas de *G. mellonella* con *E. faecalis* JH2-2 (curvas rojas) y con la mutante en el gen *oadB*, *E. faecalis* JH2-2-OadB<sup>-</sup> (curvas celestes) a  $1 \times 10^7$  (panel A),  $3 \times 10^7$  (panel B) y  $5 \times 10^7$  UFC/larva (panel C).

Como se puede ver en la Fig. 18, la mutante JH2-2-OadA<sup>-</sup> también provoca menores tasas de muerte que la cepa WT cuando se la inocula en el rango de  $1 \times 10^7$  a  $3 \times 10^7$  UFC/larva ( $P < 0.001$ ). Con esta se obtiene un 87.5% de supervivencia para la menor concentración inoculada. Nuevamente, a valores altos de UFC/larva no pudimos encontrar diferencias con los efectos de la cepa WT ( $P = 0.11$ ).

Los resultados presentados reflejan una diferencia en los porcentajes de supervivencia obtenidos para las cepas mutantes en los genes *oad* (0% para la mutante OadB<sup>-</sup> y 5% para la OadA<sup>-</sup> a  $3 \times 10^7$  UFC/larva luego de 72h) y la cepa JHCit<sup>-</sup> (100% a  $4 \times 10^7$  UFC/larva y 72h). Esto podría deberse a las distintas capacidades para metabolizar el citrato en cada caso, las cuales jugarían un papel fundamental al momento de desarrollar la infección. Pese a ello, los datos obtenidos hasta el momento sugieren que la infección desarrollada en *G. mellonella* luego de la inyección con las células de *E. faecalis* JH2-2 se beneficia de un metabolismo de citrato activo en la bacteria.

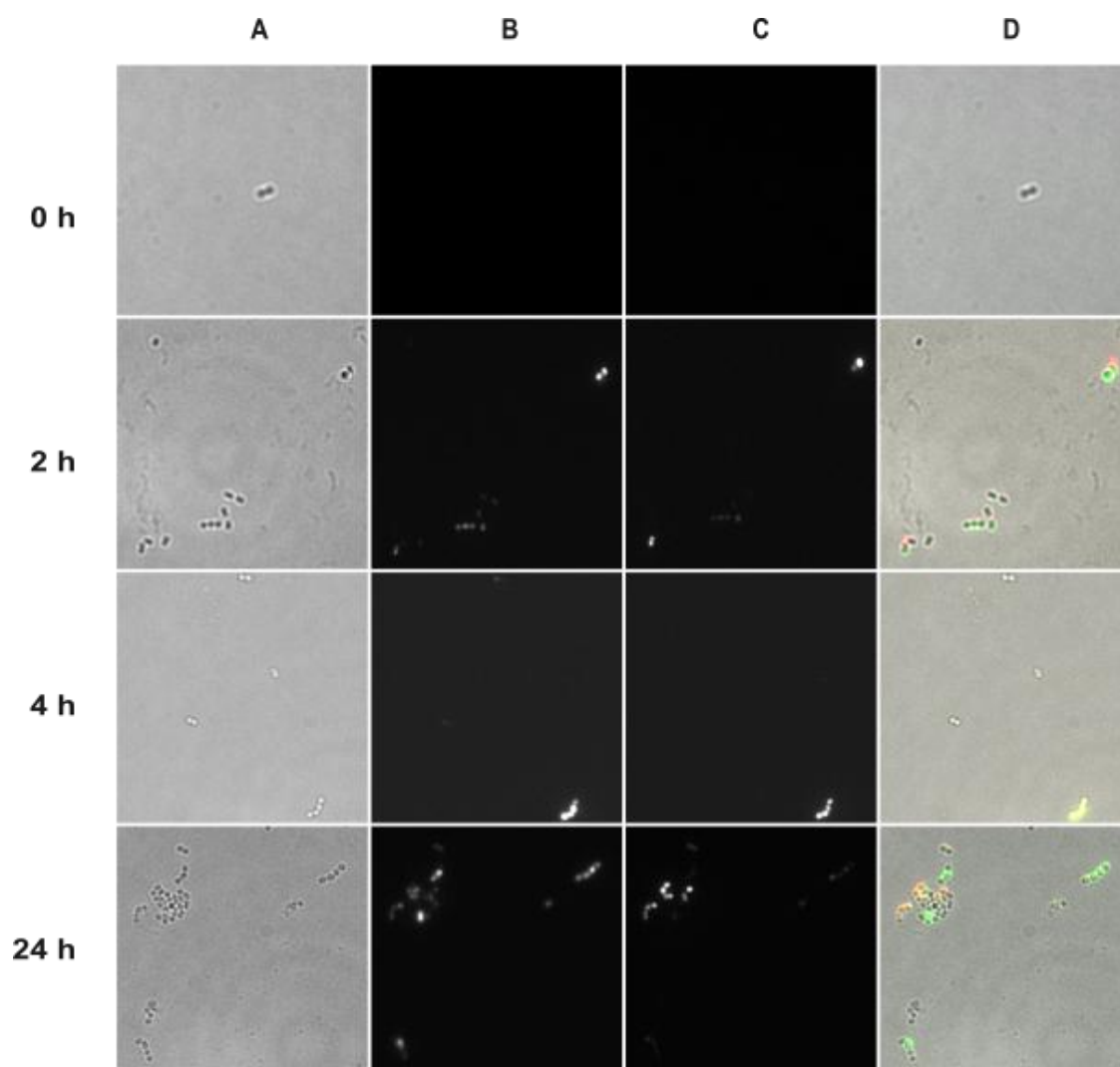


**Fig. 18. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para la mutante JH2-2-OadA<sup>-</sup>.** Se inocularon larvas de *G. mellonella* con *E. faecalis* JH2-2 (curvas rojas) y con la mutante en el gen *oadA*, *E. faecalis* JH2-2-OadA<sup>-</sup> (curvas verdes), a  $1 \times 10^7$  (panel A),  $3 \times 10^7$  (panel B) y  $5 \times 10^7$  UFC/larva (panel C).

## Inducción del metabolismo de citrato de *E. faecalis* JH2-2 en fluidos de animales mamíferos

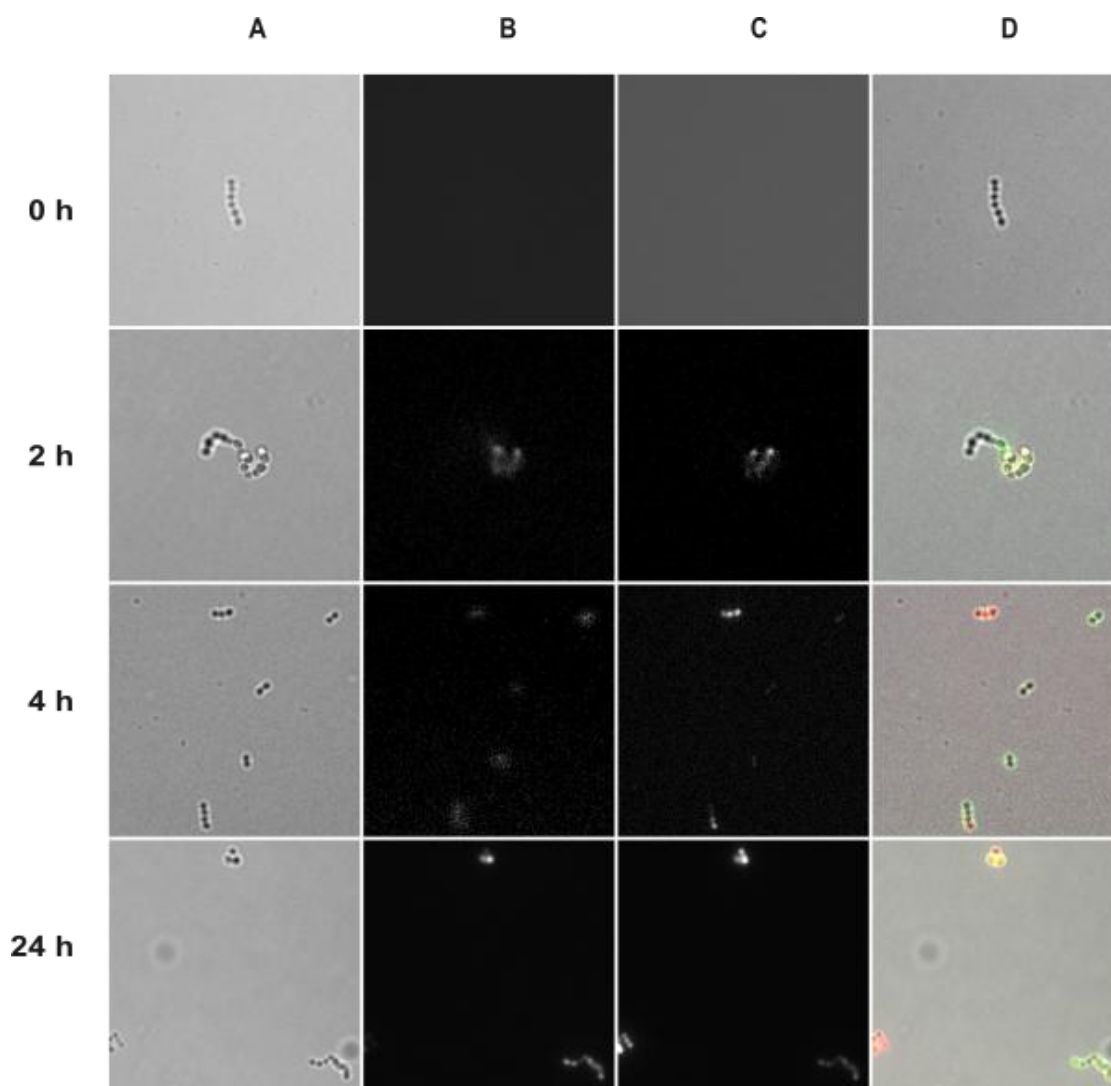
A continuación, considerando que los enterococos son causantes comunes de bacteriemia e infecciones del tracto urinario, y que el citrato (el inductor de los genes *cit*) se encuentra presente en sangre y orina (David F. Putnam, 1971; Walser, 1961), quisimos comprobar si los genes del catabolismo de citrato se expresaban en tales fluidos. Para ello, detectamos la fluorescencia de las células de JH-pTLGR-Pcit crecidas en sangre desfibrinada y orina.

Durante los crecimientos en sangre, se determinó la actividad de los promotores por fluorescencia de los genes reporteros a cuatro tiempos diferentes, a las 0, 2, 4 y 24 horas. En la Fig. 19, se muestran las imágenes capturadas. A tiempo 0h no se evidencia fluorescencia de las células. Luego de dos horas de incubación en sangre, fuimos capaces de detectar la fluorescencia tanto de la proteína GFP como de la proteína Cherry. Es decir, que no solo se verifica la expresión de los genes *cit* en sangre, sino que ambos promotores comienzan a inducir la expresión de los reporteros en las primeras horas de crecimiento. Para el caso de la cepa control JH-pTLGR no detectamos en ningún momento actividad de los promotores.



**Fig. 19. Inducción de los genes reporteros en sangre.** Se creció la cepa JH-pTLGR-Pcit por 24 horas en sangre de rata desfibrinada. Se muestran las imágenes capturadas de muestras obtenidas a 0, 2, 4 y 24 horas de incubación a 37°C, correspondientes al campo claro (A) la fluorescencia de GFP (B) y Cherry (C) y a la superposición de las anteriores (D). Aumento 60x.

Del mismo modo, cuando se incubó en orina a la cepa *E. faecalis* JH-pTLGR-Pcit por el mismo período de tiempo, luego de dos horas pudimos evidenciar la inducción del promotor Pcit cuya señal fue aumentando en el tiempo ensayado (Fig. 20).



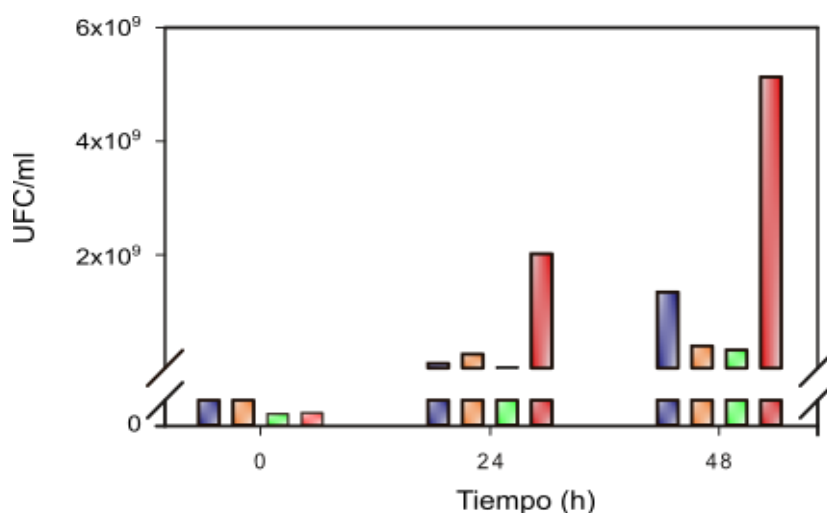
**Fig. 20. Inducción de los genes reporteros en orina.** Se creció la cepa JH-pTLGR-Pcit por 24 horas en orina humana. Se muestra las imágenes capturadas de muestras obtenidas a 0, 2, 4 y 24 horas de incubación a 37°C, correspondientes al campo claro (A) la fluorescencia de GFP (B) y Cherry (C) y a la superposición de las anteriores (D). Aumento 60x.

### El metabolismo de citrato favorece la supervivencia de *E. faecalis* en hemolinfa, sangre y orina

Para verificar si la presencia de un metabolismo de citrato activo influencia el crecimiento de los enterococos durante la infección de *G. mellonella*, realizamos recuentos de bacterias en la hemolinfa luego de las inoculaciones. Para ello, inoculamos grupos de larvas con la cepa *E. faecalis* JH2-2 y las diferentes mutantes en el

metabolismo de citrato derivadas. Luego, a distintos tiempos extrajimos la hemolinfa de una muestra de individuos, formamos una mezcla de éstas y la diluimos para realizar el recuento de UFC/ml de hemolinfa en placa.

Realizamos análisis estadísticos comparativos de los valores de UFC/ml calculados a los tiempos 0, 24 y 48 h post inoculación. Pudimos confirmar que luego de 24h de infección, la cepa JH2-2 es capaz de alcanzar valores de UFC mayores que las cepas mutantes JH2-2-Cit<sup>-</sup>, JH2-2-OadA<sup>-</sup> y JH2-2-OadB<sup>-</sup> (Fig. 21,  $p < 0.01$  para todas las comparaciones WT vs mutante). A su vez, a 24 y 48 h no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el recuento total de bacterias de las cepas mutantes ( $P > 0.4$  para todas las comparaciones) (Fig. 21).

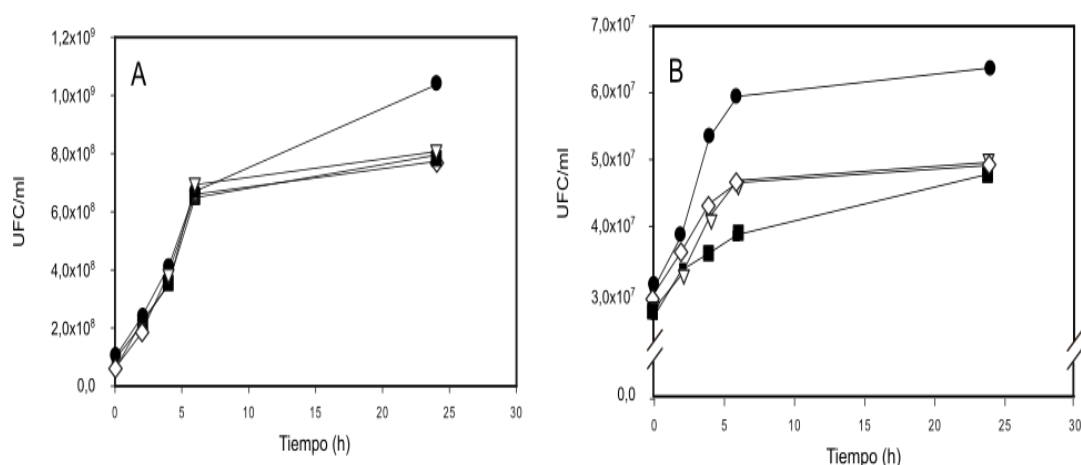


**Fig. 21. Recuento de UFC en la hemolinfa de larvas infectadas con la cepa WT y mutantes en el metabolismo de citrato.** Se representan el total de UFC/ml de hemolinfa extraída a tiempo 0, 24 y 48 horas, para larvas inoculadas con  $9 \times 10^6$  UFC de las cepas JH2-2 (barras rojas), JHCit<sup>-</sup> (barras verdes), JH2-2-OadB<sup>-</sup> (barras anaranjadas) y JH2-2-OadA<sup>-</sup> (barras azules).

Estos resultados indican que las cepas mutantes son incapaces de alcanzar la carga bacteriana final que la cepa WT consigue. Para esclarecer el rol del metabolismo de citrato en el proceso infectivo, realizamos cultivos de las cepas en estudio en extractos totales de hemolinfa y en hemolinfa libre de células. Realizamos recuentos de bacterias viables luego de varios tiempos de incubación pero no encontramos diferencias significativas en el crecimiento de las cepas mutantes y la WT en las dos condiciones. Es decir, no pudimos establecer que la cepa WT creciera mejor en hemolinfa libre de células debido la presencia de citrato en este medio, ni tampoco en presencia de hemocitos en comparación con las mutantes. Adicionalmente, comparamos el crecimiento de *E. faecalis* JH2-2 y las diferentes mutantes en sangre y



orina (Fig. 22 A y B). En sangre desfibrinada, no encontramos diferencias significativas en los crecimientos hasta 6 h ( $P=1$ ). No obstante, luego de 24 horas, la cepa WT alcanza una densidad celular mayor que las cepas mutantes ( $P<0.05$ ; Fig. 22 A). En orina, nuevamente encontramos diferencias significativas entre las mutantes y la cepa parental (Fig. 22 B;  $P<0.05$ ). Estos resultados (Fig. 22) indican que las cepas mutantes son capaces de crecer menos efectivamente en sangre y orina respecto de la cepa WT JH2-2.



**Fig. 22. Recuento de UFC/ml de sangre (A) y orina (B).** Se realizaron cultivos con la cepa WT (círculos negros), la mutante JHCit<sup>-</sup> (rombos blancos), JH2-2-OadB<sup>-</sup> (cuadrados negros), JH2-2-OadA<sup>-</sup> (triángulos blancos).

Como consecuencia, los resultados presentados en las Fig. 21 y Fig. 22 sugieren que la presencia de un metabolismo de citrato activo en la cepa JH2-2 influye positivamente en el proceso de infección y al mismo tiempo le permite a la cepa crecer mejor en fluidos animales.

## Discusión capítulo I

*Enterococcus faecalis* es un comensal natural de la microbiota gastrointestinal tanto de animales de sangre caliente como de insectos. La habilidad intrínseca de esta bacteria para resistir ambientes hostiles le permiten persistir en hospitales y competir con las defensas dentro de los hospedador que infecta (Riboulet et al., 2007).

Sin embargo, las cepas de *E. faecalis* también están asociadas a la producción alimenticia e incluso existen algunas con propiedades probióticas (Foulquié Moreno et al., 2006; Giraffa, 2003; Nueno-Palop y Narbad, 2011; Ogier y Serror, 2008). De este modo, es común encontrar a miembros de esta especie en diversos tipos de alimentos fermentados, sean comerciales o tradicionales, lo cual los convierte en parte de la dieta humana a lo largo del mundo.

En este contexto, la fermentación de citrato es una propiedad deseada en las BAL, dado que contribuye al desarrollo de aroma (Repizo et al., 2011, Zuljan et al., 2016). De hecho en *E. faecalis* esta vía metabólica se encuentra ampliamente distribuida entre sus cepas y su aporte a la generación de compuestos de aroma ha sido estudiada previamente (Blancato et al., 2008; Repizo et al., 2011, 2013).

En este capítulo demostramos que la presencia de los genes *cit* en la cepa *E. faecalis* JH2-2 también contribuye favorablemente al proceso de infección de la cepa en el animal modelo *G. mellonella*, permitiéndole provocar una elevada mortalidad de individuos.

De hecho, todas las cepas mutantes en los genes *cit* ensayadas presentaron una capacidad reducida de infección. Cuando se utilizó la cepa mutante JHCit<sup>-</sup> (generada por interrupción del operón *oadH-citG*), cuya capacidad para metabolizar citrato se ve anulada, observamos una reducción en la mortalidad provocada en *G. mellonella*, resultados comparables a los producidos por microorganismos inocuos.

En concordancia, las mutantes por eliminación de los genes que codifican a las subunidades enzimáticas OadA y OadB poseen una virulencia menor que la cepa WT. Sin embargo no logran reducir la mortalidad a los mismos niveles que la cepa JHCit<sup>-</sup>. Estas mutantes por delección, a diferencia de la primera, aún pueden convertir el citrato hasta oxaloacetato, ya que la mutación no afecta la inducción y expresión del transportador ni de la enzima citrato liasa (Repizo et al., 2013). La mutante JH2-2-OadA<sup>-</sup>

sería incapaz de la posterior conversión de este subproducto en piruvato ya que la subunidad OadA es esencial para el correcto funcionamiento del complejo de descarboxilación soluble. La mutante en el gen *oadB*, conserva la descarboxilasa citosólica completa, lo cual podría permitir una conversión del oxaloacetato a piruvato, pero a una velocidad menor (Repizo *et al.*, 2013). De este modo, las diferencias metabólicas entre las mutantes planteadas, podrían explicar las diferencias observadas respecto de la supervivencia provocada por cada una de ellas en *G. mellonella*.

Todos estos resultados sugieren que la utilización de citrato, presente en la hemolinfa de *G. mellonella*, puede otorgarle a la cepa JH2-2 una ventaja en la supervivencia en el interior de la larva.

Al mismo tiempo, la habilidad para infectar pacientes inmunocomprometidos ha situado a *E. faecalis* como una causa común de bacteriemia e infecciones del tracto urinario (Agudelo Higueta y Huycke, 2014; Arias y Murray, 2012; Flores-Mireles *et al.*, 2015; Hidron *et al.*, 2008). De hecho muchos de los genomas disponibles, pertenecen a cepas provenientes de sangre u orina aislada de pacientes hospitalizados (Kropp *et al.*, 2014; Lee, 2013).

En este capítulo presentamos evidencia no solo de la activación de los promotores del grupo de genes *cit* de *E. faecalis* JH2-2 en la hemolinfa de *G. mellonella*, sino también en sangre y orina. La presencia de citrato en estos medios fue descrita previamente (David F. Putnam, 1971; Walser, 1961; Wyatt, 1961). Lo anterior señalaría que la cepa JH2-2 podría utilizar citrato durante los procesos infectivos, de modo tal que la presencia de esta vía metabólica contribuiría a la supervivencia en diferentes fluidos animales.

Vebø y colaboradores (2009) han propuesto que la habilidad de *E. faecalis* V583 para infectar sus hospedadores depende de una interacción organizada entre los mecanismos regulatorios de ciertos factores de virulencia y de determinantes genéticos, los cuales definen la adaptación de la fisiología bacteriana durante los procesos de infección. Los datos transcriptómicos obtenidos en estudios de crecimientos de *E. faecalis* en sangre y orina, reflejan la necesidad de la bacteria de ajustar su fisiología con el propósito de adaptarse a los cambios en las condiciones nutricionales (Vebø *et al.*, 2009, 2010). De hecho, en estos fluidos (sangre y orina), encontraron que los sistemas ABC de transporte de azúcares, hierro, manganeso y

oligopéptidos modulaban su expresión, así como también lo hacían los genes del metabolismo de citrato. A su vez, también se modificaban en su expresión factores de virulencia reconocidos como *fsrB* [EF1821], *gelE* [EF1818], *cpsC* [EF2493], *ace* [EF1099] y *efaA* [EF2076] (Vebo *et al.*, 2009, Vebo *et al.*, 2010). Esto sugiere que la capacidad infectiva de este enterococo se ve influenciada por pequeñas contribuciones de diferentes metabolismos.

Los resultados presentados en este capítulo comprueban un mayor recuento celular tanto durante el proceso infectivo en *G. mellonella*, como durante el crecimiento en sangre y orina, para la cepa WT respecto de las mutantes. Esto indicaría, no solo que un metabolismo de citrato activo favorece la supervivencia de *E. faecalis* en la hemolinfa, sino que en los fluidos de mamíferos le otorga una ventaja de crecimiento.

La generación de piruvato a través de la vía de fermentación de citrato y su posterior conversión a compuestos de aroma se ha relacionado a la homeostasis de pH en diferentes BAL (García-Quintáns *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2004; Zuljan *et al.*, 2014). La generación de compuestos C4 neutros lleva a una alcalinización del medio. Ésto no solo ha sido reportado para BAL sino que también para bacterias Gram negativas. En particular, en *V. cholerae* la producción de C4 lleva a periodos de crecimiento más prolongados, lo cual tiene un efecto en la patogenicidad de la bacteria (Yoon y Mekalanos, 2006), mientras que en *B. subtilis* permite la mayor dispersión de las cepas en el ambiente (Kinsinger *et al.*, 2005). La persistencia de la cepa JH2-2 en el interior de las larvas de *G. mellonella* podría estar favorecida por una mejor capacidad para contrarrestar el estrés ácido ocasionado por los macrófagos, respecto de las cepas mutantes. Esto le permitiría a la cepa WT crecer mejor y multiplicarse en la hemolinfa, que contiene citrato.

Por último, el grupo de genes *cit* está presente en el total de las cepas de la especie *E. faecalis*, independientemente de su origen (datos no incluidos en este trabajo de tesis).

Todo lo expuesto indica la importancia de esta ruta metabólica para el crecimiento, la persistencia o la colonización de diferentes nichos en estos microorganismos. La presencia de los genes *cit* durante la infección de *G. mellonella* le permitiría a la cepa *E. faecalis* JH2-2 colonizar la hemolinfa de manera más eficiente que las cepas mutantes, generando una mayor mortalidad de individuos, en los tiempos

ensayados. En concordancia, en sangre y orina los genes *cit* le otorgan a la bacteria una ventaja en el crecimiento.

### Conclusiones parciales

- ✓ Se utilizaron exitosamente fusiones a proteínas fluorescentes para detectar la actividad de los operones *cit* en diferentes fluidos.
- ✓ Se determinó que los promotores de los genes *cit* de la cepa *E. faecalis* JH2-2 se inducen en la hemolinfa de *G. mellonella*.
- ✓ Se demostró que las inoculaciones con la cepa *E. faecalis* JH2-2 producen una reducción considerable de la supervivencia de *G. mellonella*, mientras que la cepa *E. faecalis* JHCit<sup>-</sup> resultó significativamente menos virulenta, mostrando un fenotipo similar al de la cepa inocua *L. lactis* IL1403.
- ✓ Se comprobó que las cepas mutantes JH2-2-OadB<sup>-</sup> y JH2-2-OadA<sup>-</sup> también provocan menores tasas de muerte que la cepa WT con inóculos de baja concentración.
- ✓ Se comprobó que en la hemolinfa de *G. mellonella*, las cepas mutantes son incapaces de alcanzar la carga bacteriana final que la cepa WT consigue.
- ✓ Se confirmó la expresión de los genes *cit* en sangre y orina de mamíferos y que las cepas mutantes son capaces de crecer menos efectivamente en sangre y orina respecto de la cepa WT.
- ✓ Se probó que la infección desarrollada en *G. mellonella* luego de la inyección con las células de *E. faecalis* JH2-2 se favorece de un metabolismo de citrato activo en la bacteria.
- ✓ Se demostró la importancia de la elección de *G. mellonella* como modelo ya que nos permitió realizar un análisis aproximativo a la relación entre la activación de los genes *cit* y el progreso de la infección.

## Resultados capítulo II

Diversidad genética de la vía de degradación de citrato en  
*Enterococcus faecium*

La calidad final de los quesos no solo depende del cultivo iniciador sino que también de los microorganismos capaces de crecer durante el proceso de maduración. *Enterococcus* constituye uno de los principales géneros de microorganismos presentes en los quesos, cuyas actividades metabólicas son relevantes en las etapas finales de la producción y, por consiguiente, su protagonismo es motivo de estudio.

Al inicio de este trabajo de tesis, los datos sobre la capacidad para fermentar citrato de la especie *E. faecium* eran contradictorios y escasos (Cabral et al., 2007; De Vuyst et al., 2011; Sarantinopoulos et al., 2003; Vaningelgem et al., 2006). Al mismo tiempo, la información acerca de los genes involucrados en este metabolismo era inexistente. Esta situación motivó la caracterización de dicha ruta degradativa en estos microorganismos.

En nuestro laboratorio se identificaron, a diferencia de lo descrito para otras BAL, tres poblaciones distintas respecto del metabolismo de citrato dentro de la especie *E. faecium* (Quintana, 2013). Dos de ellas poseían los genes *cit* (poblaciones Cit<sup>+</sup>), la otra carecía de los mismos (población Cit<sup>-</sup>). Dentro de las cepas Cit<sup>+</sup>, detectamos un grupo de microorganismos cuyos genes *cit* eran de Tipo I (en concordancia con lo descrito para las cepas de *L. lactis* CRL264 o *W. paramesenteroides* J1) y un grupo con genes *cit* de Tipo II (como se describió para *E. faecalis* o *Lb. casei*) (Fig. 23, ver detalles en introducción).

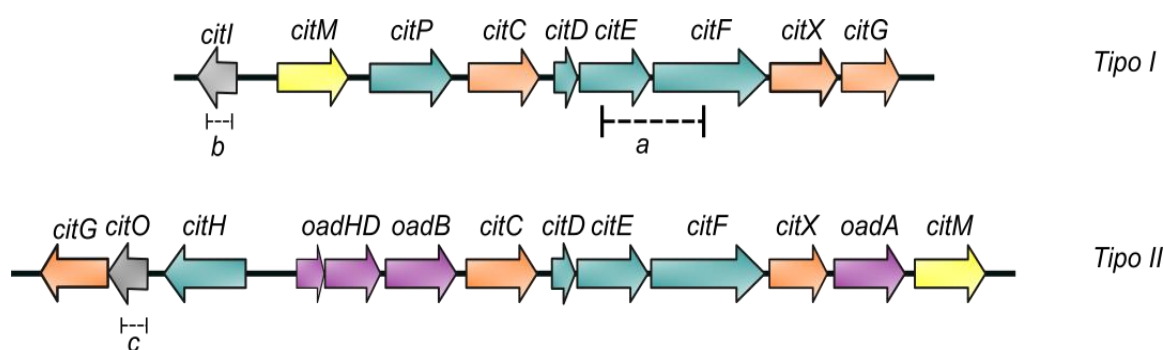
En la Fig. 23 se representan los dos tipos de grupos de genes *cit* encontrados en las cepas secuenciadas y disponibles al inicio de esta tesis para la especie *E. faecium*. Hallamos el Tipo I presente en las cepas *E. faecium* NRRL-B2354 (NC\_020207.1), 1.230.933 (NZ\_ACAS 0000 0000.1), Com15 (NZ\_ACBD 00000000.1), 1.231.501 (NZ\_ACAY 00000000.1) y 1,231,502 (NZ\_ACAX 00000000.1), mientras que el Tipo II en las cepas *E. faecium* TX1330 (NZ\_ACHL00000000.1), Com12 (NZ\_ACBC00000000.1), 1,231,408 (NZ\_ACBB00000000.1) y 1,141,733 (NZ\_ACAZ00000000.1).

Al mismo tiempo, se aislaron cepas de enterococos a partir de quesos regionales, que fueron tipificadas por medio de análisis de secuencia del ARNr 16s y pruebas fenotípicas comunes (Quintana, 2013; Suarez et al., 2012). A través de PCR, se corroboró la presencia o ausencia de los genes del metabolismo del citrato en dichos aislamientos, y de las 17 cepas analizadas, solo pudimos encontrar cepas Cit<sup>-</sup> y Cit<sup>+</sup> de Tipo I (7 cepas, Tabla 5).

**Tabla 5.** Clasificación fenotípica y genotípica de las cepas de *E. faecium* aisladas en el laboratorio.

Cepa	KM	Agregación	Amplicón a	Amplicón b	Amplicón c	Clasificación en tipo
IQ22	–	–	+	+	–	I
IQ23	–	+	+	+	–	I
IQ25	–	+	+	+	–	I
IQ101	–	–	–	–	–	Cit <sup>–</sup>
IQ103	–	–	–	–	–	Cit <sup>–</sup>
IQ110	–	–	–	–	–	Cit <sup>–</sup>
IQ121	–	–	–	–	–	Cit <sup>–</sup>
IQ167	–	–	+	–	–	Cit <sup>+</sup>
IQ336	–	+	–	–	–	Cit <sup>–</sup>
GM70	–	–	+	+	–	I
GM71	–	+	+	+	–	I
GM72	–	–	–	–	–	Cit <sup>–</sup>
GM75	–	–	+	+	–	I
GM152	–	+	–	–	–	Cit <sup>–</sup>
GM156	–	–	–	–	–	Cit <sup>–</sup>
GM203	–	–	–	–	–	Cit <sup>–</sup>
GM241	–	–	–	–	–	Cit <sup>–</sup>

KM: reacción en medio Kempler y McKay; amplicones a, b y c se indican en la Fig. 23, +: PCR positiva, –: PCR negativa.



**Fig. 23.** Organizaciones génicas de los grupos de genes cit de Tipo I y II encontrados en las cepas secuenciadas disponibles de *E. faecium*. Se marcan con las letras a, b y c las regiones amplificadas por PCR para clasificar los aislamientos de laboratorio (Tabla 5).

A partir de la anterior clasificación, estudiamos en ambos tipos de cepas de *E. faecium* encontradas (Cit<sup>–</sup> y Cit<sup>+</sup> Tipo I) su capacidad para producir compuestos de aroma relevantes en los quesos, en relación al metabolismo del citrato.



## Selección de cepas y descripción preliminar

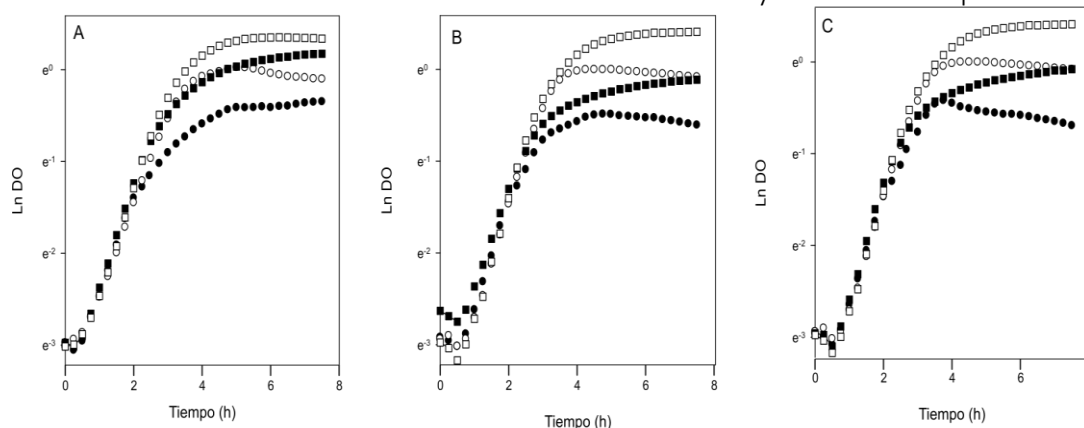
Para iniciar esta parte del trabajo se eligieron cepas de *E. faecium* del grupo de diecisiete aislamientos. Tuvimos en cuenta que cada una de ellas debía representar un fenotipo y genotipo en particular.

Al realizar los cultivos en medios líquidos, ciertas cepas presentaron un comportamiento diferente. De los diecisiete aislamientos, cinco de ellos propiciaban la formación de agregados celulares en medio de cultivo líquido, que permanecían en suspensión aún luego de un proceso de agitación mecánica (“Agregación” en Tabla 5). Por consiguiente y considerando que dicho fenotipo establecía otra diferencia entre las cepas, seleccionamos la cepa IQ23 como cepa Cit<sup>+</sup> formadora de agregados, la cepa GM75 como cepa Cit<sup>+</sup> sin fenotipo de agregación y la IQ110 como cepa Cit<sup>-</sup> (Tabla 5).

A continuación, analizamos su capacidad para crecer en medio de cultivo LB, a pH 7, y el efecto que producía la adición de citrato (15 mM) o glucosa (30 mM) sobre el crecimiento (Tabla 6). Se registró la densidad óptica por 8 horas y se realizaron curvas de crecimiento (Fig. 24). Todas las cepas fueron capaces de crecer en medio LB sin suplementos, revelando formas similares en las curvas (DO<sub>600</sub> finales de  $0,64 \pm 0,07$ ;  $0,64 \pm 0,07$  y  $0,65 \pm 0,04$ , para las cepas IQ110, IQ23 y GM75 respectivamente; Fig. 24).

Cuando se adicionó glucosa 30 mM al medio de cultivo (G), nuevamente observamos patrones similares en las curvas de las diferentes cepas, sin embargo se produjeron mayores crecimientos que en medio LB (Fig. 24 y Tabla 6). Esto es usual para las BAL, ya que requieren de una fuente de carbono para sustentar su crecimiento. A pesar de que las velocidades de crecimiento no reflejan estas diferencias, los valores de DO máximas son mayores que los obtenidos en medio LB ( $0,86 \pm 0,09$ ;  $1,1 \pm 0,2$  y  $1,04 \pm 0,03$ , para la cepa IQ110, IQ23 y GM75 respectivamente; Tabla 6).

La adición de citrato 15 mM al medio (C) permitió a las cepas Cit<sup>+</sup> crecer mejor que en medio LB ( $1,05 \pm 0,05$  y  $1,04 \pm 0,03$ , para la cepa IQ23 y GM75, respectivamente), a diferencia de la cepa IQ110 Cit<sup>-</sup> ( $0,67 \pm 0,06$ ) que alcanzó valores de DO similares en las dos condiciones comparadas (Tabla 6). Esto muestra que las cepas Cit<sup>+</sup> utilizan citrato como fuente de carbono y energía, lo cual les estaría permitiendo un mayor crecimiento final.



**Fig. 24.** Curvas de crecimiento en medio LB (círculo negro) suplementado con citrato (círculo blanco), con glucosa (cuadrado negro) o ambos (cuadrado blanco). A) cepa IQ23, B) cepa GM75 y C) cepa IQ110.

Cuando tanto glucosa como citrato son adicionados a las mismas concentraciones ya utilizadas (C y G), todas las cepas alcanzaron valores de crecimiento máximos (Tabla 6). Aún la cepa IQ110, que era incapaz de utilizar citrato, cuando éste se adiciona al medio junto al azúcar es capaz de alcanzar DO mayores que para el resto de las condiciones ( $1,4 \pm 0,1$ ).

**Tabla 6.** Crecimiento en medio LB, LBC, LBG y LBCG de las cepas *E. faecium* IQ110, IQ23 y GM75. C: citrato 15 mM, G: glucosa 30 mM

Cepa	Medio	Suplemento	$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$\text{DO}_{\max}$
IQ110	LB	–	$1,32 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,07$
	LB	C	$1,33 \pm 0,06$	$0,67 \pm 0,06$
	LB	G	$1,49 \pm 0,03$	$0,86 \pm 0,09$
	LB	C y G	$1,50 \pm 0,02$	$1,4 \pm 0,1$
IQ23	LB	–	$1,09 \pm 0,03$	$0,64 \pm 0,07$
	LB	C	$1,03 \pm 0,01$	$1,05 \pm 0,05$
	LB	G	$1,15 \pm 0,04$	$1,1 \pm 0,2$
	LB	C y G	$1,23 \pm 0,01$	$1,46 \pm 0,04$
GM75	LB	–	$1,19 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,04$
	LB	C	$1,28 \pm 0,004$	$1,04 \pm 0,03$
	LB	G	$1,3 \pm 0,1$	$0,93 \pm 0,01$
	LB	C y G	$1,41 \pm 0,03$	$1,50 \pm 0,02$

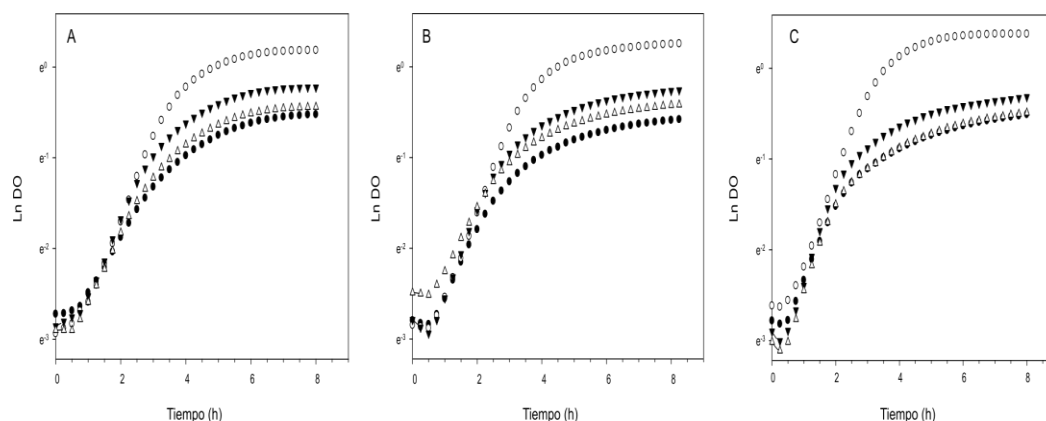
Considerando que la cepa IQ110 carece de los genes del metabolismo de citrato, este resultado podría explicarse en base a la capacidad de las soluciones de citrato para regular el pH del medio de cultivo. El consumo de glucosa como fuente de carbono en

BAL implica un proceso fermentativo en el cual se producen, en última instancia, compuestos ácidos (ácido láctico, principalmente). Como consecuencia de ello, el pH del medio en el cual crecen las BAL desciende. En un cultivo discontinuo, donde no hay renovación de los sustratos, esto conduce a una disminución de la velocidad de crecimiento y una menor DO final obtenida. Como la solución de citrato funciona comúnmente como solución tampón, ésta es capaz de mantener los valores de pH finales levemente más elevados que en ausencia de la misma y permitir consecuentemente un mejor crecimiento bacteriano.

Para verificar si el citrato mejora el crecimiento en presencia de glucosa, aún en las cepas Cit<sup>-</sup>, realizamos curvas de crecimiento en medio LB suplementado con glucosa 30 mM y diferentes concentraciones de citrato (0,5, 2 y 15 mM) a pH inicial de 5.5. El pH fue elegido lo suficientemente bajo como para limitar el crecimiento, pero aún permitir que éste suceda.

Cuando se crecieron las cepas en LB y glucosa 30 mM (LBG), todas las cepas alcanzaron valores de DO máximas similares ( $0,59 \pm 0,03$ ;  $0,56 \pm 0,03$ ;  $0,60 \pm 0,06$ ; para las cepas IQ23, GM75 e IQ110, respectivamente; Fig. 25). Cuando se adiciona citrato 0,5 mM a la condición anterior, la cepa IQ110 produjo resultados semejantes a la condición LBG ( $0,61 \pm 0,08$ ), mientras que las cepas Cit<sup>+</sup> logran valores de DO apenas mayores ( $0,64 \pm 0,01$  y  $0,66 \pm 0,03$ , para la cepa IQ23 y GM75, respectivamente; Fig. 25). No obstante, a medida que se adicionó citrato a una mayor concentración, todas las cepas crecieron hasta alcanzar valores de DO superiores. Cuando se suplementa el medio con citrato 2 mM la cepa IQ23 alcanza una DO final de  $0,80 \pm 0,03$ , la cepa GM75  $0,77 \pm 0,01$  y la IQ110  $0,73 \pm 0,05$ . Cuando se utilizaron concentraciones de 15mM se obtuvieron los mejores crecimientos para todas las cepas ( $1,20 \pm 0,02$ ;  $1,29 \pm 0,04$ ;  $1,5 \pm 0,2$ , para las cepas IQ23, GM75 e IQ110 respectivamente).

En la Fig. 25 se puede observar que en la medida que mayor cantidad de citrato está disponible en el medio, mejor es el crecimiento bacteriano, aún en la cepa Cit<sup>-</sup> IQ110. Es decir que, en condiciones de pH no ideales, el citrato mejora el crecimiento celular, no solo por el efecto de consumo del mismo por parte de las cepas Cit<sup>+</sup> sino que por un efecto tampón. Éste ha sido descrito previamente para cepas de *E. faecalis* y *Lb. Rhamnosus* (de Figueroa et al., 1996; Sarantinopoulos et al., 2001).

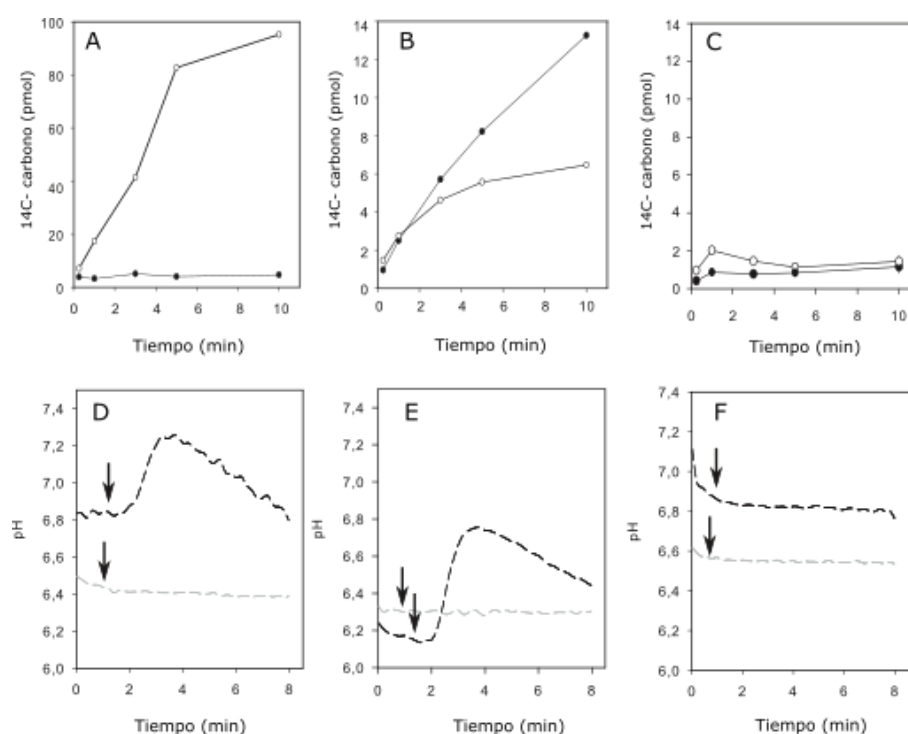


**Fig. 25. Efecto del citrato en el crecimiento a pH bajo.** Se crecieron las cepas IQ23 (A), GM75 (B) e IQ110 (C) en medio LB suplementado con glucosa 30mM a pH inicial de 5,5 en ausencia (círculo negro) o presencia de citrato 0,5 mM (triángulo blanco), 2mM (triángulo negro) y 15 mM (círculo blanco).

A continuación, utilizando cultivos bacterianos en condición de “Resting Cells” (RC, ver materiales y métodos), demostramos el comportamiento diferencial de las tres cepas en estudio tanto en el transporte al interior celular como en la degradación de citrato. Brevemente, el transporte fue analizado por la incorporación de citrato marcado radioactivamente a células de *E. faecium*, mientras que la metabolización intracelular fue ensayada midiendo el pH citosólico con la sonda fluorescente sensible BCECF (Invitrogen®). Ya que el consumo de citrato lleva a una alcalinización del interior celular, debido a la generación de un gradiente de protones y la producción de especies menos ácidas, la sonda nos permite monitorear los cambios de pH internos de las células en tiempo real (Magni et al., 1999). De este modo, indirectamente, podemos evidenciar la degradación de citrato luego de ser adicionado externamente, en las condiciones de ensayo.

En la Fig. 26 se muestran los resultados obtenidos cuando las cepas se crecieron en medio LB suplementado con citrato 15mM (LBC) o glucosa 30 mM (LBG). En la Fig. 26C se evidencia la incapacidad de la cepa *E. faecium* IQ110 para incorporar citrato a las células tanto en medio LBC como LBG. Contrariamente, *E. faecium* IQ23 fue capaz de transportar citrato cuando fue crecida en LBC (velocidad: 13,7 pmol/min) pero no en medio LBG (Fig. 26A). La cepa GM75 mostró una incorporación significativa de citrato radiactivo en las dos condiciones de crecimiento (velocidad para LBG: 2,1 pmol/min y para LBC: 1,7 pmol/min; Fig. 26B).

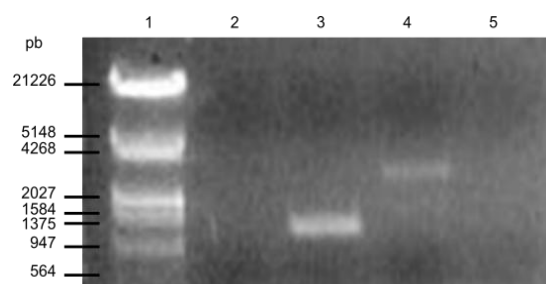
En los ensayos de metabolización intracelular, se adicionó citrato en tiempo real a RC de las cepas de *E. faecium* crecidas en las dos condiciones planteadas (LBC y LBG). Posteriormente se determinaron los cambios en el pH celular interno. Tal como se muestra en la Fig. 26F, y en concordancia con los resultados previos, la cepa IQ110 crecida en LBG o LBC fue incapaz de alcalinizar el medio interno luego de la adición externa de citrato. Del mismo modo, las cepas IQ23 y GM75 crecidas en medio LBG, no evidenciaron un aumento en el pH intracelular luego del agregado de citrato (Fig. 26D y E). Sin embargo, ambas cepas crecidas en medio LBC respondieron elevando el pH interno frente al agregado de citrato externo (Fig. 26D y E). Cabe destacar, que la cepa GM75 que mostró la incorporación de citrato en la condición de crecimiento LBG, no evidenció degradación del mismo en los ensayos de alcalinización intracelular, lo cual señala una diferencia fenotípica con la cepa Cit<sup>+</sup> IQ23. Estos últimos resultados sugieren fuertemente que la ruta completa degradativa de citrato está activa en las dos cepas de *E. faecium* Cit<sup>+</sup> en la condición LBC y no en la condición LBG.



**Fig. 26. Transporte de citrato y metabolismo en las cepas de *E. faecium*.** Cepas IQ23 (gráficos A y D), GM75 (B y E) y IQ110 (C y F). Panel superior: experimentos de transporte utilizando citrato radioactivo. Los círculos negros indican los crecimientos en LBG, mientras que los blancos en LBC. Panel inferior: determinación del pH interno por medio de la sonda fluorescente BCECF. Las curvas de color negro indican a las cepas crecidas en medio LB suplementado con citrato 15mM (LBC), mientras que las curvas grises corresponden a medio suplementado con glucosa 30mM (LBG). Se indica la adición de citrato a la cubeta por medio de una flecha.

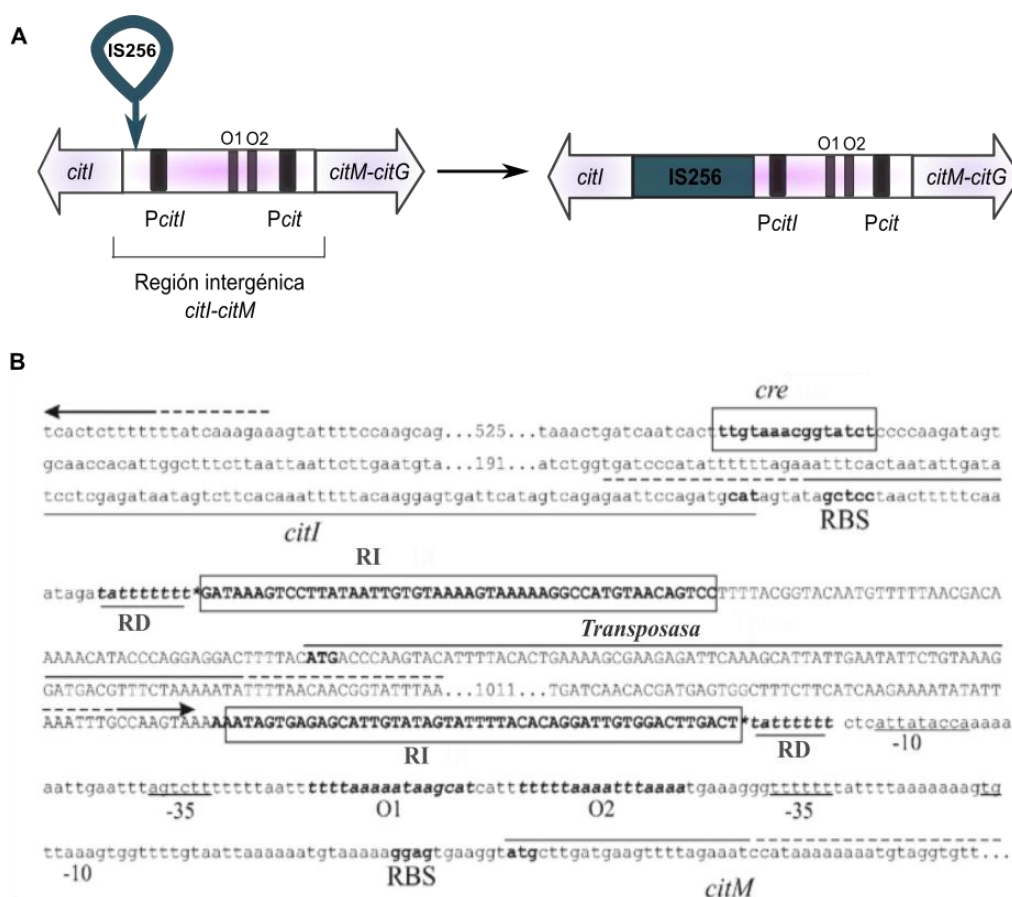
Para obtener mayor información respecto de las diferencias detectadas entre las cepas Cit<sup>+</sup> *E. faecium* IQ23 y GM75, estudiamos la región intergénica *citM-citI* en cada una de ellas por medio de PCR (Fig. 27). Se diseñaron y utilizaron oligonucleótidos que hibriden sobre la secuencia de *citI* y *citM* (ver materiales y métodos), de manera tal que el amplicón generado contuviera a la secuencia del regulador, la región intergénica y parte del gen *citM*.

El amplicón obtenido para la cepa IQ23 resultó de 1400 pb aproximadamente, mientras que para la GM75 de alrededor 2500 pb (Fig. 27). El análisis in silico detallado de las secuencias amplificadas nos permitió identificar una copia completa de la secuencia de inserción IS256 (Fig. 28 A) en la región intergénica de la cepa GM75. Este elemento móvil ampliamente diseminado, fue descrito inicialmente en *Staphylococcus aureus* (Lyon et al., 1987). La región *citM-citI* de la cepa IQ23 resultó tener una longitud de 187 pb mientras que la de la cepa GM75 de 1519 pb. La posición exacta de la inserción se muestra en la Fig. 28 A y B.



**Fig. 27. Detección de la inserción en la región intergénica *citI-citM* en la cepa GM75.** Corrida electroforética en gel de agarosa utilizando los oligos CitI\_Bamh1Up y CitI\_Bamh1Lo. Calles: 1, marcador de peso molecular  $\lambda$  EcoRI-HindIII; 2, control negativo (cepa IQ110); 3, cepa IQ23; 4, cepa GM75; 5, control de reactivos.

A continuación, tomamos la secuencia completa del amplicón obtenido para la cepa GM75 y realizamos un blastn (Altschul et al., 1990) sobre las bases de datos Whole-Genome Shotgun Contigs (WGS) y Nucleotide Collection (nr/nt), limitando la búsqueda dentro del taxón *E. faecium*. Los resultados arrojados indicaron que la IS256 está presente en la población de *E. faecium*, pero no encontramos otra cepa con la inserción en idéntico sitio.



**Fig. 28. A)** Modelo del mecanismo de inserción de la IS256. Se muestran los genes *citI* y la región *citM-citG*, entre ellos la región intergénica con los sitios promotores (*PcitI* y *Pcit*) y operadores predichos (*O1* y *O2*). **B)** Detalle de las secuencias contenidas en el sitio de integración de la IS256. Parte de los genes *citM* y *citI* se muestran. El gen de la transposasa se halla flanqueado por repeticiones invertidas imperfectas (*RI*) y repeticiones directas (*RD*). También se muestran los sitios *cis*: *RBS* para *citI* y *citM*, los operadores putativos *O1* y *O2* para *CitI*, el sitio *CRE* predicho dentro del gen *citI* y las cajas -10 y -35 mencionadas en el texto para *citI* y *citM*.

La confirmación de la presencia de esta inserción en la cepa GM75 establece una diferencia fundamental entre las cepas de *E. faecium* de organización de Tipo I. Además, al localizarse en un sitio de putativas regiones regulatorias *cis*, esta IS podría afectar la expresión de los genes *cit*. Por otro lado, la cepa GM75 sería una mutante natural de la ruta del citrato, que no se ve afectada de manera negativa en la utilización del mismo, ya que en medio LBC la es capaz de utilizarlo (Fig. 24 y Fig. 26).

Debido a que la IS256 se localiza en la región que separa dos putativos operones (*citI* y *citMPCDEFXG*), se analizó la región intergénica *citM-citI* en busca de probables secuencias promotoras y sitios de unión de proteínas regulatorias, cuya funcionalidad podría haberse afectado en la cepa GM75.

Por medio del programa BPROM (Solovyev y Salamov, 2011) se realizó una búsqueda de promotores en las dos cepas Cit<sup>+</sup>. Las regiones promotoras predichas para el operón *citM-citG* para las cepas IQ23 y GM75 coinciden. En ambas se hallaron la secuencia TGTTAAgT que correspondería a la región -10 de los promotores bacterianos reconocidos por  $\sigma^{70}$  (consenso: TATAAT) 37 pb corriente arriba del sitio de inicio de traducción de *citM* y, 60 pb corriente arriba, la secuencia TTtttt que correspondería a la región -35 (consenso: TTGACA) (Fig. 28 B). Se marcan con letra minúscula los nucleótidos que no coinciden con los consensos. La baja homología de la caja -35 con el consenso (solo dos nucleótidos están conservados) podría ser compensada por la presencia de una caja -10 extendida (TGNTATAAT). Dado que las predicciones son coincidentes en las dos cepas Cit<sup>+</sup>, podríamos concluir que la IS256 no afectaría directamente las secuencias promotoras del operón *citM-citG* (Fig. 28 B).

En la búsqueda de promotores para el gen *citI*, se encontraron las siguientes secuencias para la cepa IQ23: TGGTATAAT para la región -10 y aaGACt para la -35, ubicadas 39 y 62 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción de *citI*, respectivamente. En el caso de la cepa GM75, la inserción de la IS256 interrumpe la región, de modo tal que las secuencias mencionadas para la cepa IQ23 fueron localizadas pero a 1372 pb corriente arriba de *citI* (Fig. 28 B). En su lugar, el software fue capaz de predecir un promotor diferente que se localiza dentro de la región no codificante izquierda de la IS256. Éste contiene a las secuencias TtAcAcAAT (73 pb corriente arriba del ATG de *citI*) y TTacat (51 pb corriente arriba), como regiones -10 y -35 respectivamente. No se realizaron ensayos fisiológicos para determinar si estos sitios promotores predichos eran funcionales.

La Fig. 28 A muestra un modelo del mecanismo de inserción de la secuencia identificada como IS256 en la cepa mutante. Esta IS se caracteriza por poseer regiones repetidas invertidas imperfectas en los extremos izquierdo y derecho de la secuencia (RI e RD, respectivamente), secuencias no codificantes a continuación de éstas y en medio el gen codificante de una enzima transposasa. A su vez, genera repeticiones en tándem en la secuencia diana (Fig. 28 B).

Debido a que la presencia de la IS256 entre los genes *cit* en la cepa GM75, podría afectar el fenotipo de esta cepa, decidimos buscar una nueva cepa de *E. faecium* Cit<sup>+</sup> Tipo I. Para descartar posibles inserciones dentro del conjunto de genes *cit*,



repetimos la PCR utilizada previamente (Fig. 27) con el resto de las cepas identificadas en el laboratorio como Cit<sup>+</sup> (descriptas en la Tabla 5). Todas las cepas generaron amplicones de tamaño similar al generado por la cepa IQ23 (no mostrado), es decir que no evidenciaban la presencia de ninguna inserción. A continuación, realizamos curvas de crecimiento en medio LB con diferentes suplementos para seleccionar aquellas cepas clasificadas como Cit<sup>+</sup> que presentaran un mejor crecimiento en presencia de citrato. Todas las cepas *cit*<sup>+</sup> fueron capaces de crecer con citrato como fuente de carbono. En base a ello y teniendo en cuenta que la cepa seleccionada no sea formadora de agregados, se seleccionó la cepa GM70 para posteriores ensayos (Tabla 7).

**Tabla 7.** Velocidades de crecimiento y DO máximas para la cepa GM70 en medio LB, LBC, LBG y LBGC.

Medio de cultivo	$\mu$ máxima (h <sup>-1</sup> )	DO máxima
LB	1,12 ± 0,03	0,75 ± 0,03
LBC	0,98 ± 0,02	1,14 ± 0,02
LBG	1,137 ± 0,003	1,08 ± 0,01
LBGC	0,97 ± 0,01	1,67 ± 0,03

### Producción de compuestos de aroma: diacetilo y acetoína

Como se especificó en la introducción, los enterococos aportan de manera significativa al sabor y la textura de los quesos estacionados. En quesos como el Cheddar o el Camembert, la generación de compuestos de cuatro carbonos (C4) como el diacetilo y la acetoína es necesaria para conseguir sus sabores típicos de estos productos (Smit et al., 2005; Yvon y Rijnen, 2001).

Es parte del interés de nuestro grupo de trabajo establecer la conexión entre la ruta fermentativa de citrato y aquellas involucradas en la producción de aroma. Esto es, determinar si las cepas que son capaces de utilizar el citrato disponible en el medio (para el caso de los quesos, el citrato en la leche) presentan una ventaja sobre las cepas Cit<sup>-</sup> respecto de la generación de compuestos de aroma.

Inicialmente, para determinar si las cuatro cepas de *E. faecium* en estudio podían producir acetoína y diacetilo en medio LB, utilizamos la reacción cualitativa de Voges-Proskauer (VP; Barry y Feeney, 1967) sobre cultivos líquidos. Tal como se describe en materiales y métodos, la aparición de una coloración rosada en los tubos

indica que la cepa fue capaz de producir diacetilo o acetoína (que se oxida a diacetilo durante la reacción) en las condiciones de cultivo.

Se realizaron cultivos en medio LB, LBC (15mM de citrato), LBG (30mM de glucosa) y LBCG (citrato y glucosa simultáneamente, a las anteriores concentraciones) de las cepas IQ110, IQ23, GM75 y GM70 en tubos sin agitación a 37°C, a pH 7, toda una noche. En la Tabla 8, se muestran los resultados de la reacción de VP sobre los sobrenadantes de tales cultivos. En medio LB sin suplementar ninguna de las cepas fue capaz de producir la típica coloración rosada producto de la aparición de diacetilo o acetoína. En contraste, en medio LBC todas las cepas Cit<sup>+</sup> (IQ23, GM75 y GM70) dieron un resultado positivo.

Este resultado indica la existencia de una relación entre la vía de producción de C4, a cargo de las enzimas ALS y ALD, y la vía de catabolismo del citrato, ya que luego del agregado de este metabolito las cepas Cit<sup>+</sup> son capaces de generar diacetilo y/o acetoína. Es decir, la degradación del citrato generaría los intermediarios necesarios para la vía de aroma.

**Tabla 8. Producción cualitativa de aroma en medio LB, LBC, LBG y LBCG.** +: reacción positiva; -: reacción negativa; I: resultado intermedio. C: citrato 15mM; G: glucosa 30 mM.

Cepa	LB	LBC	LBG	LBCG
<b>IQ23</b>	-	+	-	-
<b>GM75</b>	-	+	-	I
<b>GM70</b>	-	+	-	I
<b>IQ110</b>	-	-	-	-

A diferencia de lo anterior, cuando se adiciona glucosa 30 mM al medio no se evidencia la aparición de color rosado en ninguno de los casos. Considerando que el producto final del metabolismo de la glucosa y del citrato es el piruvato, y que éste es el sustrato de la enzima ALS, ambas rutas podrían contribuir a la producción de aroma. Consecuentemente, los resultados son evidencia de la estrecha relación entre las vías de degradación de citrato y de producción de aroma. Mientras las moléculas de piruvato producidas por glucólisis parecen destinarse a otros fines, gran parte de aquellas producidas a partir de citrato seguirían la ruta C4.

Por último, cuando se adiciona citrato y glucosa de manera conjunta, observamos diferentes resultados. El cultivo de la cepa IQ23, previamente capaz de

producir aroma a partir de citrato, en medio LBCG da un resultado negativo, mientras que las cepas GM70 y GM75 presentan coloraciones tenues, que calificamos como intermedias. La cepa IQ110 como no produjo diacetilo o acetoína en dicha condición de crecimiento.

Es importante destacar que este ensayo tiene carácter cualitativo, es decir, que no nos permite emitir conclusiones acerca de la cantidad de compuestos de aroma producidos en cada condición y para cada cepa. Para profundizar sobre las diferencias observadas entre las cepas, en estas condiciones de cultivo, realizamos el ensayo cuantitativo de Voges-Proskauer.

En este ensayo, se preparan inicialmente RC de las cepas de *E. faecium*, modo tal que en cada tubo haya una cantidad equivalente de células (misma DO). A pesar de que un valor de DO no puede relacionarse a la cantidad de células vivas en un cultivo, al trabajar con cultivos en fase exponencial asumimos que la diferencia es despreciable y que los cultivos son comparables independientemente de la cepa o la condición. En el estado de RC se considera que las células se encuentran metabólicamente activas pero no hay crecimiento celular.

Los resultados que se presentan a continuación describen dos condiciones. A una la denominamos “de cultivo”, en donde se indica cómo fue crecida la cepa hasta llegar a fase exponencial que, para el caso de rutas metabólicas no constitutivas, determinará qué enzimas estarán activas en dicha condición. La otra, que denominamos “de incubación”, refiere a las células recolectadas de los cultivos anteriores y preparadas como RC. Estas últimas serán incubadas durante una hora en estufa a 37°C junto a un suplemento determinado. Al sobrenadante de este tubo se le medirá la concentración de diacetilo.

Como consecuencia, se puede determinar si los compuestos de aroma se generan a partir del sustrato introducido en la condición de incubación y por medio de las enzimas expresadas en la condición de cultivo. Al ser un ensayo de tipo cuantitativo nos permite estimar y comparar en qué proporción se producen el diacetilo y acetoína.

Nos interesó estudiar el rol de la glucosa y otros azúcares en presencia de citrato, así como también del piruvato. Las cantidades de diacetilo y acetoína generadas se determinaron por medidas de absorbancia relativas a una curva de calibración de diacetilo y se expresan en la Tabla 9.

Cuando los enterococos fueron crecidos en medio LB a pH 7 e incubados posteriormente con citrato 15mM, solo fuimos capaces de detectar cantidades bajas pero significativas de diacetilo en la cepa GM75 ( $(9,5 \pm 0,2) \mu\text{M}$ ; Fig. 29 y Tabla 9), mientras que cantidades muy bajas fueron detectadas para el resto de las cepas (consideradas despreciables). Resultados similares fueron obtenidos cuando las cepas fueron crecidas en medio con glucosa 30mM e incubadas en RC en presencia de citrato, nuevamente solo la cepa GM75 fue capaz de producir bajos niveles de C4 (Tabla 9 y Fig. 29).

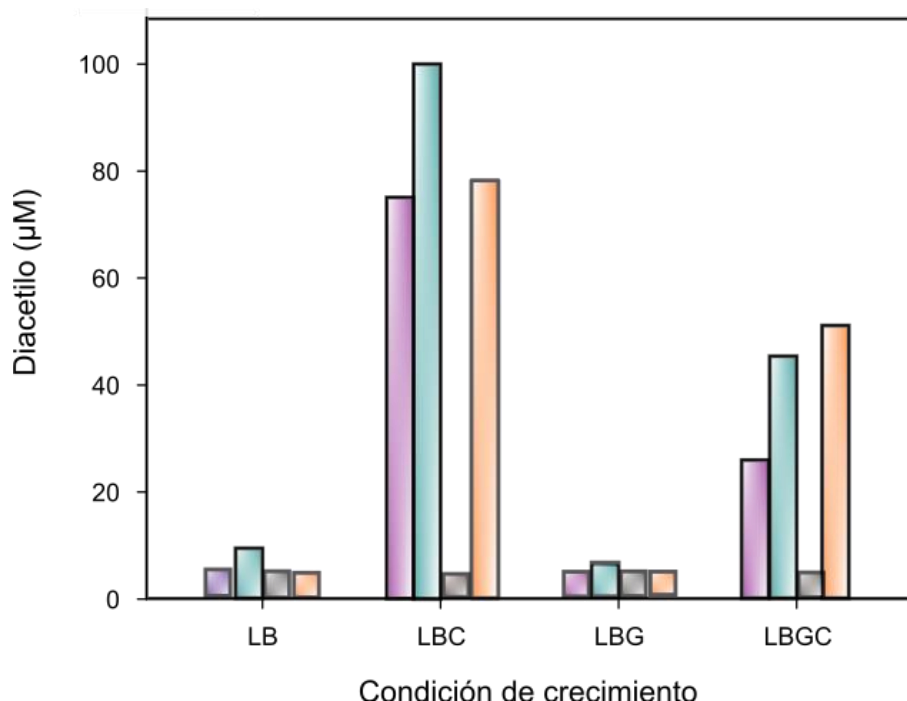
**Tabla 9. Producción de diacetilo (y/o acetoina) en Resting Cells de *E. faecium* IQ110, IQ23, GM75 y GM70.** Se indica, para la condición de crecimiento, los sustratos agregados al medio LB y para condición de incubación, los agregados al buffer de fosfato de potasio. n.d.: no detectado, cantidad de diacetilo detectada  $\leq (5,0 \pm 0,2) \mu\text{M}$ .

Condición de crecimiento	Condición de incubación	Producción de diacetilo/acetoina ( $\mu\text{M}$ )			
		IQ23	GM75	GM70	IQ110
-	Citrato	n.d.	$9,5 \pm 0,2$	n.d.	n.d.
Citrato	Citrato	$75 \pm 4$	$100 \pm 1$	$78 \pm 1$	n.d.
Glucosa	Citrato	n.d.	$6,3 \pm 0,1$	n.d.	n.d.
Ribosa	Citrato	n.d.	$15 \pm 1$	$19 \pm 1$	n.d.
Citrato + glucosa	Citrato	$26 \pm 1$	$45 \pm 1$	$51 \pm 1$	n.d.
Citrato + ribosa	Citrato	$144 \pm 5$	$285 \pm 8$	$157 \pm 8$	n.d.
-	Piruvato	$74 \pm 1$	$79 \pm 2$	$74,9 \pm 0,1$	$70 \pm 1$
Piruvato	Piruvato	$73,9 \pm 0,1$	$69,6 \pm 0,3$	$99 \pm 1$	$71 \pm 2$
Piruvato + glucosa	Piruvato	$77 \pm 1$	$72 \pm 1$	$97 \pm 1$	$73 \pm 1$
Glucosa	Glucosa	$12 \pm 1$	$26 \pm 1$	$12 \pm 1$	$20 \pm 1$
Ribosa	Ribosa	$10 \pm 2$	$20 \pm 3$	$10 \pm 1$	$16 \pm 1$

Por otro lado, las células de *E. faecium* crecidas en medio LB suplementado con citrato 15mM (LBC) e incubadas a continuación con citrato 15mM produjeron los siguientes resultados. Todas las cepas Cit<sup>+</sup> fueron capaces de producir altos valores de concentración de diacetilo y/o acetoina ( $(75 \pm 4)$ ,  $(100 \pm 1)$  y  $(78 \pm 1) \mu\text{M}$  para la IQ23, GM75 y GM70, respectivamente). En cambio, la cepa IQ110 fue incapaz de tales niveles de producción (Tabla 9 y Fig. 29 ).

Realizamos cultivos en medio LB suplementado de manera simultánea con glucosa 30mM y citrato 15mM (LBCG) e incubamos en RC con citrato 15mM. De esta forma se puede indagar acerca de la capacidad para utilizar citrato de las células cuyos

estados metabólicos han sido determinados por la presencia del azúcar sumado al citrato. Para las cepas Cit<sup>+</sup> las concentraciones de diacetilo medidas fueron significativamente menores ( $p < 0,001$ ) a las observadas en la condición de crecimiento LBC e incubación con citrato (Tabla 9 y Fig. 29).



**Fig. 29. Producción de diacetilo y acetoina luego de la adición de citrato a RCs.** Se crecieron las células en medio LB, en LB con citrato 15 mM (LBC), glucosa 30mM (LBG) o ambos (LBGC). Se cosecharon las células y se adicionó citrato 15mM en la condición de incubación. *E. faecium* IQ110 barra negra, IQ23 (barra violeta) GM75 (barra azul) y GM70 (barra naranja). El diacetilo detectado  $\leq (5,0 \pm 0,2) \mu\text{M}$  se grafica con valores de  $5.0 \mu\text{M}$  y se consideran como una concentración despreciable (n.d. en Tabla 9).

Para los enterococos, la glucosa es un azúcar de tipo PTS, lo cual en general conduce a una represión por catabolito (CCR, por las siglas en inglés de “carbon catabolite repression”; Suárez et al., 2013, 2011). Este tipo de represión se ejerce sobre otras vías metabólicas distintas a la del propio azúcar. Por consiguiente, la presencia de glucosa en el medio de crecimiento podría estar influyendo de manera negativa en la expresión de la vía metabólica del citrato o de C4, lo que conduce a una disminución en la producción de aroma.

Realizamos una búsqueda bioinformática de las vías metabólicas putativas relacionadas a la utilización de azúcares, presentes en los genomas de cepas secuenciadas de *E. faecium* por medio de Rast. Buscamos azúcares cuya única forma posible de incorporación a la célula fuera un mecanismo diferente a los sistemas de fosfotransferasa, de modo tal que el azúcar no estuviera sujeto a represión por

catabolito. Seleccionamos D-ribosa y sus efectos sobre la producción de C4 fueron comparados a los de la glucosa.

Crecimos las cepas en estudio en medio LB suplementado con ribosa y citrato (LBCR) de manera simultánea y a las mismas concentraciones antes utilizadas con glucosa. La condición de incubación se realizó solo con citrato. Todas las cepas Cit<sup>+</sup> fueron capaces de producir altos niveles de diacetilo y/o acetoína ((144±5), (285±8) y (157±8) µM para las cepa IQ23, GM75 y GM70, respectivamente; Tabla 9).

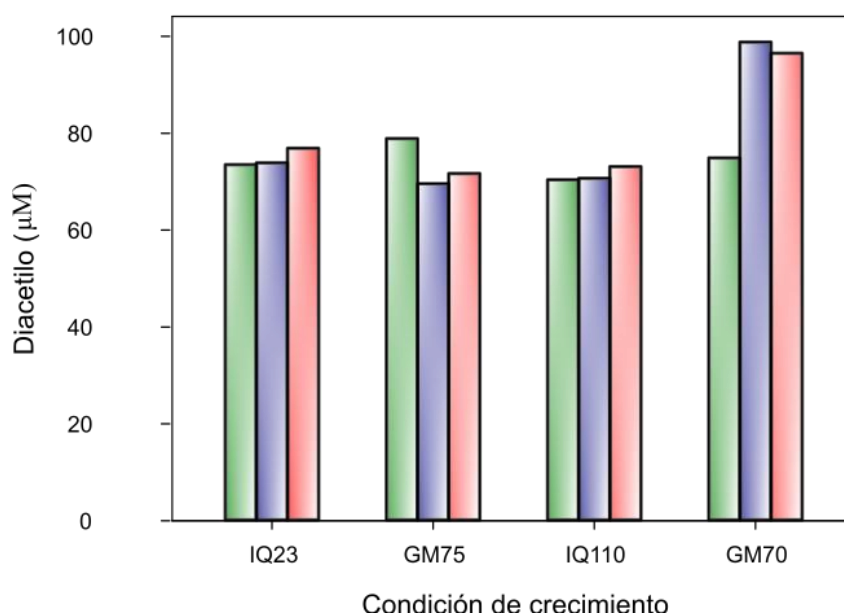
Como se puede observar en la Tabla 9, la presencia de este azúcar no-PTS no afecta negativamente la producción de aroma y, en su lugar, los valores de concentración de diacetilo medidos son altos en todos los casos. Por lo cual se podría concluir que la ribosa, no provoca una disminución en la producción de aroma tal como sucede con la glucosa. Es decir, que la glucosa reprimiría la vía metabólica de aroma a partir de citrato.

Por último, se crecieron los cuatro aislamientos en medio LB con glucosa o ribosa 30mM y se incubaron con el mismo azúcar para analizar el aporte individual de cada azúcar a la producción de aroma, a través de su fermentación (Tabla 9). Todas las cepas fueron capaces de producir diacetilo y/o acetoína en bajas concentraciones.

Para determinar si la menor producción de aroma provocada por la glucosa se debía a un efecto represor del azúcar sobre el metabolismo del citrato o sobre el anabolismo de acetoína y diacetilo, crecimos los enterococos en medio LB suplementado con piruvato 100mM (LBP) o piruvato y glucosa 30mM (LBPG), a pH 5,5. Luego, realizamos las incubaciones con piruvato 100mM. Los resultados se presentan en la Fig. 30 y la Tabla 9. Pudimos corroborar que no existen diferencias significativas entre la condición de crecimiento LBP y LBPG para ninguna de las cepas ( $p>0,45$ ). Es decir, que la cantidad de aroma producida a partir de piruvato no se ve afectada por la presencia de glucosa en la condición de crecimiento.

Estos experimentos nos sugieren que la disminución en la concentración de diacetilo medida para la condición de crecimiento LBCG podría asociarse a una represión catabólica sobre los genes *cit*, y no sobre la vía C4. Por otro lado esta última, pareciera tener una expresión de tipo constitutiva ya que a pesar del piruvato no estar presente en la condición de cultivo (condición de cultivo LB, Tabla 9), las cepas son capaces de producir aroma.

Podría afirmarse entonces lo contrario para la ruta de citrato. La ausencia de citrato en la condición de crecimiento (LB sin suplementar) impide la detección de productos de aroma luego de la incubación con el mismo compuesto orgánico (Tabla 9). A excepción de la cepa GM75 que produce una cantidad muy baja pero detectable en tales condiciones ( $6,3 \pm 0,1$   $\mu\text{M}$ ). Mientras que en presencia de citrato (condición de cultivo LBC) las cepas Cit<sup>+</sup> son capaces de generar C4 a mayores concentraciones. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para transporte y metabolización intracelular en la condición LBC (Fig. 26). De manera que, tal como sucedía con *E. faecalis* JH2-2 (Blancato et al., 2008, 2016) o *W. paramesenteroides* (Martín et al., 2000), el citrato actuaría como inductor de su propio metabolismo, lo que se puede evidenciar de manera indirecta a través de la generación de compuestos de aroma, gracias a la estrecha conexión entre ambas rutas.



**Fig. 30. Producción de diacetilo a partir de piruvato.** Se crecieron las células en medio LB (barra verde), LB suplementado con piruvato 100mM (barra azul) o LB suplementado con piruvato y glucosa 30mM (barra roja), se cosecharon y se determinó la concentración de diacetilo en el sobrenadante de RC incubadas en presencia de piruvato 100mM.

### Predicción de secuencias regulatorias

En base a resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio con las especies *W. paramesenteroides* y *E. faecalis* JH2-2, realizamos una búsqueda bioinformática de secuencias *cis* relevantes dentro de la región comprendida entre el gen *citI* y el gen *citM*

en las cepas IQ23, GM75 y GM70. Para ello utilizamos las secuencias obtenidas luego de la reacción de PCR especificada en la Fig. 27.

El mecanismo general de represión catabólica involucra la interacción del complejo formado por el regulador transcripcional global CcpA y su co-represor HPr fosforilado en el residuo de serina 46 (HPr-P-Ser) con la secuencia de ADN denominada Cre (Deutscher et al., 2005, 2006). En la bibliografía no existe una secuencia consenso para el sitio Cre de *E. faecium*, por lo cual utilizamos en esta búsqueda la secuencia de *Bacillus subtilis* (TGNAARCGNWWCA, Kim y Chambliss, 1997) y las de *E. faecalis* (TGNANCGNTNWCA, Leboeuf et al., 2000) y (WTGWAARCGYWWCW, Opsata et al., 2010).

De esta manera, detectamos en las tres cepas Cit<sup>+</sup> una secuencia con homología a los tres consensos utilizados ubicada en la región codificante de *citI* (Fig. 28B). La localización de este sitio Cre putativo impediría la correcta transcripción del regulador CitI, lo cual afectaría la expresión del resto de los genes *cit*.

Por otro lado nos interesó buscar sitios operadores dentro de las regiones intergénicas *citI-citM*, a los cuales el regulador CitI fuera capaz de unirse para inducir la expresión de los genes tal como fue sugerido en los experimentos anteriores. Utilizamos para tal fin las secuencias consenso determinadas por Martin et al., 2005, de *W. paramesenteroides* denominadas O1 y O2 (O1: TTTTAAWATWWRAAH y O2: TTTWAAWATTTAAAA). Estos elementos *cis* son reconocidos por la proteína CitI (activador transcripcional de la ruta en esta especie), que se une e induce su propia expresión y la del resto de los genes *cit*. Como consecuencia, la presencia de regiones análogas en *E. faecium* serían necesarias para que existiera una inducción equivalente.

Se encontraron sitios O1 y O2 putativos idénticos, en las cepas GM75, GM70 e IQ23 (Fig. 28B). Esto indicaría que en estas cepas Cit<sup>+</sup> de Tipo I el metabolismo de citrato funcionaría en formas similares a lo descripto para *W. paramesenteroides*. No obstante, de acuerdo a los ensayos de transporte, metabolización intracelular y producción de aroma, la cepa GM75, que posee la IS256 insertada en la región intergénica *citI-citM*, muestra una regulación menos estricta de los genes *cit*. En esta cepa detectamos el transporte de citrato para la condición de cultivo LBG (es decir, en ausencia del inductor putativo) y la generación de compuestos de aroma a partir de citrato en las condiciones de cultivo LB y LBG. En contraste, la misma cepa no



demuestra una alcalinización del citosol significativa en los ensayos de metabolización intracelular luego de ser crecida en el medio LBG.

### Descripción preliminar de las cepas de *E. faecium* Cit<sup>+</sup> de Tipo II

Dado que no fuimos capaces de aislar a partir de quesos regionales cepas de *E. faecium* con grupos de genes *cit* Tipo II, indagamos en las bases de datos la representatividad de esta organización dentro de la especie. Utilizando la herramienta BLAST y la secuencia del gen *citO* de *E. faecalis* JH2-2, pudimos determinar cuáles de éstas cepas contenían a los genes *cit* de Tipo II.

A continuación, teniendo en cuenta las cepas detectadas, se solicitaron las mismas al laboratorio del Dr. Axel Hartke de la Universidad de Caen. Dicho laboratorio disponía de las cepas *E. faecium* Com12 (NZ\_ACBC000000000.1), *E. faecium* 1,231,408 (NZ\_ACBB000000000.1) y *E. faecium* 1,141,733 (NZ\_ACAZ000000000.1) con las cuales iniciamos la descripción de los *E. faecium* Cit<sup>+</sup> de Tipo II.

Tal como se trabajó con los enterococos aislados de queso y para confirmar que dichas cepas posean la organización de genes *cit* de Tipo II, procedimos a realizar un análisis por medio de PCR. Para ello usamos oligonucleótidos específicos para la secuencia del gen *citO* de *E. faecium* (ver materiales y métodos). Como controles realizamos reacciones con cebadores para *citI* de *E. faecium* y para *citE* de *E. faecalis*. Utilizamos las cepas Com12, 1,231,408 y 1,141,733, junto a la cepa de *E. faecium* Tipo I GM70, la cepa Tipo II de *E. faecalis* JH2-2 y la cepa Cit- IQ110.

Como se detalla en la Tabla 10, las cepas Com12 y 1,141,733 dieron reacciones positivas para la amplificación de *citO* de *E. faecium*, mientras que la cepa 1,231,408 dio resultado negativo a esa misma reacción. Sin embargo, la cepa 1,231,408 dio un resultado positivo a la PCR para *citE* de *E. faecalis*. Luego de confirmar la secuencia del amplicón resultante, se decidió descartar esta cepa de los subsiguientes ensayos (Tabla 10) dado que resultó idéntica a *citE* de *E. faecalis*.

A continuación realizamos diferentes ensayos sobre las cepas Com12 y 1,141,733, no obstante se mostrarán los resultados obtenidos para la cepa Com12, ya que son equivalentes a los obtenidos para la cepa 1,141,733.

Realizamos curvas de crecimiento y medidas de producción de aroma cuantitativas (Tabla 11 y Tabla 12). Realizamos las curvas de crecimiento en medio LB a pH7, sin suplementar, suplementado con citrato 15mM, con glucosa 30mM o con glucosa y citrato simultáneamente (Tabla 11). Los resultados obtenidos para la cepa Com12 se asemejan a los de la cepa Cit<sup>-</sup> IQ110 (Tabla 6), ya que la adición de citrato no modifica la curva obtenida en medio LB. Esto refleja una incapacidad de la cepa para usar el citrato como fuente de carbono en las condiciones ensayadas.

**Tabla 10.** Resultados de las PCRs realizadas sobre las cepas de *E. faecium* de Tipo II.

Gen amplificado	Resultado de la PCR por cepa					
	Com12	1,231,408	1,141,733	JH2-2	IQ110	GM70
<i>citO</i> ( <i>E. faecium</i> )	+	-	+	-	-	-
<i>citI</i> ( <i>E. faecium</i> )	-	-	-	-	-	+
<i>citE</i> ( <i>E. faecalis</i> )	-	+	-	+	-	-

**Tabla 11.** Valores de DO máximas y velocidades de crecimiento máximas para la cepa Com12

Cepa	Medio	Suplemento	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	DO <sub>max</sub>
Com12	LB	-	1,17 ± 0,01	0,79 ± 0,02
	LB	C	1,05 ± 0,01	0,72 ± 0,01
	LB	G	1,28 ± 0,03	0,8 ± 0,2
	LB	C y G	1,46 ± 0,01	1,28 ± 0,01

En concordancia con los resultados anteriores, las mediciones de la concentración aroma producido a partir de citrato también reflejan un comportamiento similar a la cepa IQ110. Solo fuimos capaces de detectar diacetilo cuando en la condición de incubación se adiciona piruvato 100 mM independientemente de la condición de crecimiento ((83±2), (95±1) y (98,1±0,3)  $\mu$ M para la condición de crecimiento LB, LBP y LBPG, respectivamente) o cuando se crecen las cepas en presencia de glucosa o ribosa y se las incuba con los mismos sustratos ((29 ± 2) y (16 ± 2)  $\mu$ M, para glucosa y ribosa respectivamente, Tabla 12).

Estos resultados, nos estarían indicando que ambas cepas de Tipo II (Com12 y 1,141,733) serían incapaces de utilizar citrato para crecer y producir aroma en las condiciones ensayadas.

**Tabla 12.** Producción de diacetilo y/o acetoína para la cepa Com12.

Condición de crecimiento	Condición de incubación	Producción de diacetilo/acetoína ( $\mu\text{M}$ )
-	Citrato	n.d.
Citrato	Citrato	n.d.
Glucosa	Citrato	n.d.
Ribosa	Citrato	n.d.
Citrato + glucosa	Citrato	n.d.
Citrato + ribosa	Citrato	n.d.
-	Piruvato	$83 \pm 2$
Piruvato	Piruvato	$95 \pm 1$
Piruvato + glucosa	Piruvato	$98,1 \pm 0,3$
Glucosa	Glucosa	$29 \pm 2$
Ribosa	Ribosa	$16 \pm 2$

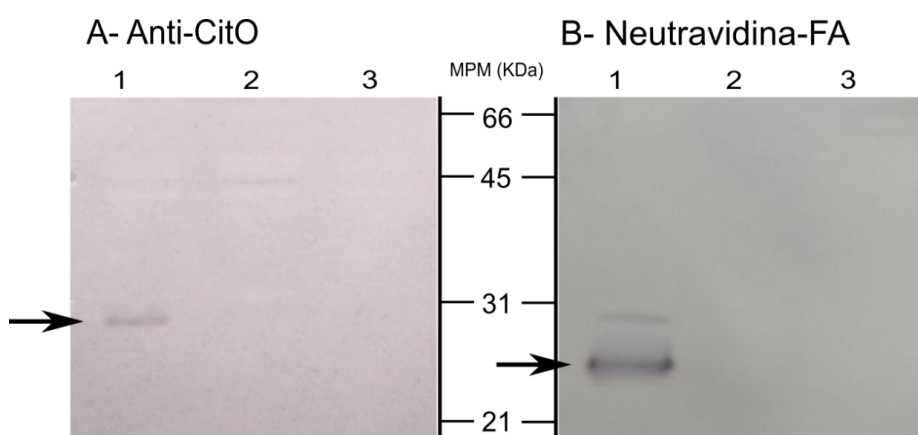
Para determinar si el citrato estaba siendo consumido por las cepas de Tipo II, realizamos medidas del pH intracelular utilizando la sonda BCECF, tal como se realizó previamente. Crecimos las cepas en medio LB suplementado con citrato 15mM (LBC) hasta fase exponencial. Cuando a las cepas Tipo II se les adicionó citrato externamente no se detectó la alcalinización del interior celular. Por el contrario, sí se detectó el ascenso en el pH cuando a las mismas células se les adicionó glucosa. Esto indica que las células son experimentalmente activas y capaces de degradar glucosa, pero son incapaces de usar el citrato para alcalinizar el medio interno (datos no mostrados).

Repetimos estos ensayos evaluando diferentes condiciones de crecimiento celular y de incubación en RC. Se ensayó tanto a pH neutro como a pH 5,8, así como en crecimientos con glucosa o con glucosa y citrato simultáneamente. Se ensayó la adición en la cubeta tanto de citrato, como citrato y diferentes metales divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) o compuestos orgánicos tales como el lactato, acetato, piruvato, diacetilo, y acetoína que permitieran el transporte de citrato al interior celular. Ninguno de los ensayos permitió la alcalinización del interior celular de las cepas de Tipo II.

En concordancia con los resultados de consumo intracelular, cuando crecimos las cepas en medio LBC y detectamos cualitativamente la aparición de productos del metabolismo del citrato por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) solo obtuvimos resultados positivos para la cepa GM70 (utilizada como control). De los cinco subproductos detectados para esta cepa, pudimos identificar tres (piruvato, lactato y acetato). Por el contrario, para la cepa control negativo IQ110 y para la cepa Com12, no se detectaron picos diferentes al correspondiente a citrato. Nuevamente, los resultados estarían señalando que el citrato no estaría siendo metabolizado por las cepas de Tipo II en las condiciones ensayadas.

Por último, realizamos ensayos de Western blot para detectar la presencia de las enzimas responsables del metabolismo del citrato. En base a la disponibilidad de anticuerpos y sondas específicas disponibles, analizamos la expresión del regulador CitO y las subunidades OadA y OadD correspondientes al complejo de la oxaloaceto decarboxilasa.

Para ello crecimos las cepas en medio LB a pH 7 en presencia de citrato 15mM o glucosa 30 mM. Utilizamos en todos los ensayos a la cepa *E. faecalis* JH2-2 como control positivo



**Fig. 31. Ensayos de Western blot para la cepa Com12.** Calle 1: Control positivo, cepa *E. faecalis* JH2-2 crecida en medio LB suplementado con citrato; calle 2: cepa Com12 crecida en medio LB suplementado con glucosa; calle 3: cepa Com12 crecida en medio LB suplementado con citrato. A) Detección de la proteína CitO con anticuerpos específicos. Se señala con una flecha la banda de tamaño menor que 31 KDa correspondiente a la proteína CitO de *E. faecalis* JH2-2; B) Detección de la proteína OadD con neutravidina conjugada a fosfatasa alcalina (FA). A la altura de la banda marcadora de peso 31 KDa se observa una banda, que por su tamaño correspondería a la proteína BCCP; se indica con una flecha la banda de tamaño menor que 31 KDa correspondiente a la proteína OadD biotinilada.

Para la detección de la proteína OadD se utilizó neutravidina conjugada a fosfatasa alcalina, la cual se une irreversiblemente al cofactor de la enzima, la biotina.

Para detectar las proteínas CitO y OadA (no mostrado) utilizamos anticuerpos monoclonales contra *E. faecalis*. En la Fig. 31 se muestran los resultados de los ensayos de Western blot con los anticuerpos anti-CitO y con neutravidina. En ninguna de las condiciones ensayadas fuimos capaces de detectar las proteínas de interés en las cepas de Tipo II. Considerando las semejanzas entre los genes *cit* de las cepas de *E. faecium* con el de *E. faecalis*, decidimos investigar acerca de la presencia de regiones regulatorias *cis* importantes que pudieran estar afectando la expresión de los genes e impidiendo el catabolismo de citrato para producir aroma o utilizarlos como fuente de carbono.

Buscamos los sitios regulatorios O1 y O2, tales como habían sido descritos para *E. faecalis* JH2-2 (Blancato et al., 2008). Detectamos sitios similares en la región intergénica *citH-oadH* de las cepas de *E. faecium*, siendo idénticos entre las cepas Com12 y 1,141,733, pero con variaciones respecto de los de *E. faecalis* JH2-2 (en letra minúscula se marcan las bases alteradas). El sitio O1 (Atg-AAAAAGAACAgagAAAAAAC) presenta seis bases diferentes, mientras que el O2 (aaAAAAGgAACAgcgAAAgACAATt) nueve.

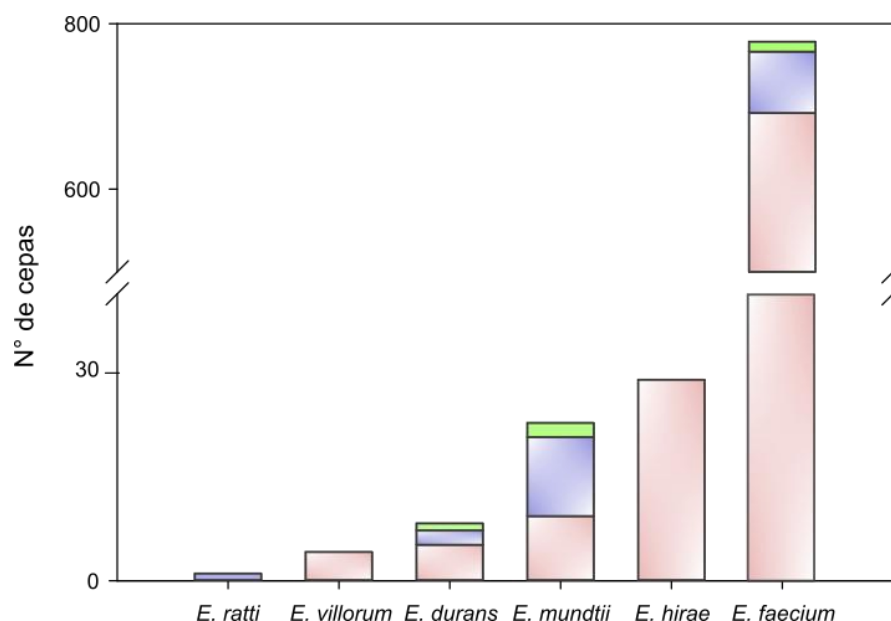
Luego, buscamos sitios promotores putativos semejantes a los encontrados para *E. faecalis* JH2-2 (Blancato et al., 2008). No pudimos localizar sitios idénticos. No obstante, utilizando el programa BPROM (Solovyev y Salamov, 2011) pudimos predecir dos promotores bacterianos dentro de la región intergénica *citH-oadH*, con puntajes bajos.

Por último, buscamos sitios reguladores Cre. En la cepa *E. faecalis* JH2-2 nuestro grupo fue capaz de identificar tres de estas secuencias, denominados *cre1*, *cre2* y *cre3*. Cre1 y Cre2 son responsables de la represión por catabolito sobre el operón *citHO*, mientras que el sitio Cre3 es quien regula la expresión del operón *citCL* (Suárez et al., 2011b). Fuimos capaces de localizar dos secuencias semejantes: *cre1*, con una base diferente a la de la cepa JH2-2 (TGTAAtGGTGA), sobre el gen codificante del transportador y *cre2*, con una identidad del 100%, en la región intergénica *citH-oadH*. Finalmente, *cre3* no pudo encontrarse.

### Análisis de los genes *cit* en el grupo *E. faecium*

El grupo *E. faecium* comprende a las especies *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. mundtii*, *E. ratti* y *E. villorum* (De Graef et al., 2003; Dworkin y Falkow, 2006). No obstante, las cepas aisladas en mayor proporción a partir de alimentos y en clínica pertenecen a la especie *E. faecium* (Foulquié Moreno et al., 2006; Martín et al., 2009; Panesso et al., 2010). Esta diferencia se observa en el elevado número de secuencias genómicas disponibles en las bases de datos online para esta especie, a diferencia del resto de las especies que conforman el grupo *E. faecium* (Fig. 32).

Utilizando el sitio web del NCBI obtuvimos la lista completa de cepas del grupo *E. faecium* secuenciadas disponibles en Genbank y Refseq. Esta lista, está compuesta por 779 cepas de *E. faecium*, 28 de *E. hirae*, 11 de *E. mundtii*, 7 de *E. durans*, 4 de *E. villorum* y 1 de *E. ratti* (hasta agosto de 2017; Fig. 32). Utilizando la herramienta blastx y la secuencia del gen *citF* de *E. faecium* NRRL-B2354, determinamos el número de cepas Cit<sup>+</sup> dentro del total de secuencias. Luego, con la secuencia de *citI* de la misma cepa de referencia y *citO* de *E. faecalis* JH2-2 determinamos el tipo de grupo de genes *cit* (Tipo I o Tipo II) para cada una. A excepción de *E. villorum* y *E. hirae*, todas las especies analizadas poseen al menos una cepa Cit<sup>+</sup>. Encontramos que 2 cepas de *E. durans*, 74 de *E. faecium* y una de *E. ratti* poseían el grupo de genes *cit* de Tipo I (Fig. 32). Mientras que solamente 12 cepas de *E. faecium*, 2 de *E. mundtii* y 1 de *E. durans* poseían el de Tipo II. Curiosamente, encontramos cepas en *E. faecium* (UC8668 AWWN000000000.1 y EnGen0003 AHXC000000000.1) y en *E. durans* (ATCC 6056 ASWM000000000.1) que poseen ambos grupos de genes en sus genomas.



**Fig. 32. Número de cepas secuenciadas y disponibles en las bases de datos Genbank y Refseq pertenecientes al grupo *E. faecium*.** Barras color rosa representa a las cepas Cit<sup>-</sup>, las barras azules a las Cit<sup>+</sup> de Tipo I y las verdes a las Cit<sup>+</sup> de Tipo II. Se consideró a las cepas secuenciadas por nuestro grupo, incluyendo a la cepa IQ23 dentro de la especie *durans*.

En la Fig. 32 puede apreciarse que las cepas Cit<sup>+</sup> dentro del grupo *E. faecium* representan un subgrupo pequeño dentro del total de cepas secuenciadas (Fig. 32, secciones azules y verdes), y que solo para las especies *E. durans*, *E. mundtii* y *E. faecium* se encuentran los dos grupos de genes *cit* dentro de una misma especie. No obstante, el número de cepas Tipo II (Fig. 32, secciones verdes) es más bajo que el de Tipo I (Fig. 32, secciones azules), hallándose el primero en 15 casos y el segundo en 77.

## Discusión capítulo II

La presencia de cepas pertenecientes al grupo *E. faecium* en alimentos no es desconocida, no obstante existen dudas en cuanto al consumo de aquellos alimentos que expliciten contenerlas, dado que muchas bacterias de este grupo son causantes de enfermedades en pacientes con sistemas inmunológicos comprometidos.

El mayor número de cepas secuenciadas dentro de este grupo pertenecen a la especie *E. faecium*. Dentro de éstas, gran parte de los aislamientos provienen de clínica, de muestras de pacientes obtenidas alrededor de todo el mundo. En consecuencia, numerosos estudios que se llevan adelante en la actualidad ponen el foco en la patogenicidad, los mecanismos de virulencia, las resistencias antibióticas o la clasificación de cepas de *E. faecium* en grupos acorde a su peligrosidad.

En contraposición, un menor número de investigaciones se han llevado a cabo en relación a los aportes de *E. faecium* a los alimentos, de los cuales forma parte como microbiota adventicia. A su vez, la diversidad genética referida a la fermentación de citrato y la generación de compuestos de aroma han sido poco estudiadas en *E. faecium* previamente.

En este capítulo presentamos evidencias de la diversidad genotípica y fenotípica de cepas pertenecientes al grupo *E. faecium* que fueron aisladas a partir de quesos regionales y otras fuentes. Las cepas Cit<sup>+</sup> de Tipo I de *E. faecium* evidenciaron fenotípicamente un metabolismo de citrato activo, demostrando una relación directa entre el consumo de citrato y la de producción de diacetilo y acetoina.

Al mismo tiempo, las cepas de genotipo Cit<sup>+</sup> de Tipo II Com12 y 1,141,733, en las condiciones estudiadas, no fueron capaces de fermentar citrato.

El análisis de los genomas de la población de cepas secuenciadas, nos permitió establecer que hay un número muy bajo de cepas Cit<sup>+</sup>, y otro aún menor de cepas de Tipo II, dentro del grupo *E. faecium*. Probablemente la baja frecuencia de esta organización génica sea el motivo por el cual no fuimos capaces de aislar en nuestro laboratorio una cepa representativa.

Es interesante destacar que el gran número de cepas que componen la especie *E. faecium* (779) nos ha permitido evidenciar la gran diversidad genotípica que las



caracteriza, incluidos los genes para la fermentación de citrato. Encontramos tanto cepas carentes de los genes *cit*, como con la organización de Tipo I, con la organización de Tipo II o ambas en simultáneo. No obstante, a diferencia de lo que sucede en *E. faecalis*, el número de cepas Cit<sup>+</sup> se divide en los tres grupos mencionados y son, pese a ello, una minoría (86 cepas).

Asimismo, encontramos una cepa única de Tipo I, debido a una modificación genética ocasionada por la inserción de un elemento móvil, la IS256. La ubicación de esta secuencia en la región intergénica *citM-citI* en la cepa GM75 establece una diferencia fundamental entre las cepas Cit<sup>+</sup> de Tipo I, y sugiere una posible modificación de la expresión génica en esta cepa. De hecho, los patrones de transporte de citrato y generación de aroma a partir de éste, se diferencian de los de las demás cepas Cit<sup>+</sup>. Los resultados indicaron que la presencia de este elemento, en esta región específica, es algo único para *E. faecium* dado que no existe otra cepa secuenciada que posea la misma reorganización génica. A su vez, la secuencia insertada en la cepa GM75 no es ajena a la población de *E. faecium*, pero, a pesar de que se encuentre en otras cepas, no se halla asociada específicamente con la población Cit<sup>+</sup>.

Nuestros datos de producción de diacetilo y/o acetoína demuestran la relevancia de un metabolismo activo de citrato para generar altos niveles de producción de aroma. De manera análoga a *W. paramesenteroides*, encontramos dos sitios operadores (O1 y O2), los cuales podrían ser esenciales para la activación de la expresión de los genes *cit* en las cepas GM70, GM75 e IQ23. Esto indicaría un mecanismo regulatorio similar entre ambas especies.

Además, la presencia de sitios Cre fue detectada en todos nuestros aislamientos, lo cual sería indicativo de un mecanismo de represión por catabolito que podría estar modulando la expresión de los genes *cit* en las cepas. De hecho, en presencia de glucosa los niveles de producción de aroma a partir de citrato disminuyen significativamente para las cepas GM70, GM75 e IQ23. Este cambio no se detecta cuando se sustituye la glucosa por un azúcar no PTS (ribosa) o bien se da la producción de aroma a partir del sustrato directo de la enzima ALS, piruvato. Este es el primer reporte de un microorganismo con organización génica Tipo I sujeto a tal mecanismo regulatorio.

A su vez, la asociación directa entre la formación de aroma y la disponibilidad de citrato, indicaría la importancia de la presencia de los enterococos en quesos regionales.

No obstante, el potencial riesgo a la salud que dichos microorganismos representan genera dudas respecto de su uso industrializado. Este hecho pone en relieve la necesidad de la exploración de las cepas existentes y de la selección de cepas para ser utilizadas como cultivos adjuntos, cuyas actividades permitan inhibir el crecimiento de otras indeseables al tiempo que generarían compuestos de aroma deseados.

### Conclusiones parciales

- ✓ Se demostró que es posible aislar de quesos regionales cepas de enterococos que poseen gran diversidad fenotípica y genotípica.
- ✓ Se estableció una clara relación entre la ruta de utilización de citrato y la de generación de acetoína y diacetilo en *E. faecium*.
- ✓ Se detectó una cepa única de *E. faecium*, GM75, que presenta la inserción de una copia completa de la IS256 en la región intergénica del operón *cit* y *citI*.
- ✓ Se observó una represión catabólica mediada por azúcares PTS (glucosa) del metabolismo de citrato de Tipo I en *E. faecium*, no así del metabolismo de diacetilo y acetoína, y se localizaron sitios Cre putativos.
- ✓ Se reveló que las cepas estudiadas de *E. faecium* con organización de genes *cit* de Tipo II son incapaces de utilizar citrato para crecer o producir compuestos de aroma en las condiciones ensayadas. Tampoco se detectó la expresión de las proteínas involucradas en este metabolismo, ni se detectaron los subproductos del mismo.
- ✓ Se expuso que las cepas Cit<sup>+</sup> dentro del grupo *E. faecium* representan un subgrupo pequeño dentro del total de cepas secuenciadas, y que solo en las especies *E. durans* y *E. faecium* se encuentran los dos tipos de organizaciones génicas representadas dentro de una misma especie.
- ✓ Se observó que la frecuencia de cepas Tipo II en el grupo *E. faecium* es muy baja, hallándose en la minoría de cepas con disponibilidad genómica.

## Resultados capítulo III

Evaluación de la seguridad y de las características metabólicas de cepas de enterococos aisladas de quesos regionales

La diversidad genómica observada en las cepas de *E. faecium* pone de relieve la importancia del estudio de las características particulares de cada una de ellas. El comportamiento dual de estos enterococos, en relación al aporte al sabor de los alimentos fermentados y a la capacidad para provocar enfermedades y mediar la transferencia de resistencias antibióticas, hace aún más relevante el estudio detallado de las potencialidades de aquellas cepas que podrían utilizarse como cultivos adjuntos en la producción industrializada de alimentos. En consecuencia, la combinación de técnicas tradicionales con aquellas genómicas predictivas se convierte en una estrategia fundamental.

A partir de la obtención de las secuencias completas de los genomas de las cuatro cepas de enterococos analizadas en este trabajo, abordamos un estudio más profundo de la diversidad genotípica existente entre ellas comparando, al mismo tiempo, estos datos con otros fenotípicos para así delinear una metodología de selección racional de cepas.

### **Análisis filogenómico y asignación de especies**

Todo análisis bioinformático comparativo requiere, en primer lugar, de un análisis filogenético. Esto se hace especialmente necesario cuando se trabaja con especies estrechamente relacionadas a otras (Espariz et al., 2016), como es el caso de las del grupo *E. faecium*. A su vez, la correcta asignación de género y especie es indispensable en las cepas destinadas a la industria alimenticia. El uso y aplicación de bacterias está altamente regulado y las pautas regulatorias dependen de la especie a la que pertenecen los microorganismos (EFSA, 2012; Joint FAO/WHO Expert Consultation, 2006).

De este modo, las lecturas obtenidas a partir de los genomas de las cepas IQ23, GM75, IQ110 y GM70 fueron ensambladas en secuencias más grandes, denominados cóntigos (en inglés “contigs”), los cuales fueron depurados y ordenados como se detalla en materiales y métodos. La depuración de los genomas de las cepas se realiza con el fin de eliminar secuencias redundantes. Eliminamos 4 cóntigos para la cepa IQ23 y 34 para la cepa GM75, mientras que para las cepas IQ110 y GM70 no encontramos

secuencias repetidas. A continuación, se ordenaron los restantes utilizando el programa Gegenees versión 2.2.1 (Ågren et al., 2012) y una cepa de referencia para cada caso. De manera resumida, Gegenees es un software para el análisis comparativo de los datos de secuencias de genomas completos que fragmenta las secuencias y compara todas las lecturas contra todos los genomas analizados. Al mismo tiempo sirve para ordenar estos fragmentos de acuerdo a la organización de un genoma de referencia.

Subsiguientemente, se realizó la anotación de funciones utilizando Rast (Overbeek et al., 2014). Los genomas se hicieron públicos a través de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Las características generales resultados de la secuenciación, ensamblados y anotación se listan en la Tabla 13.

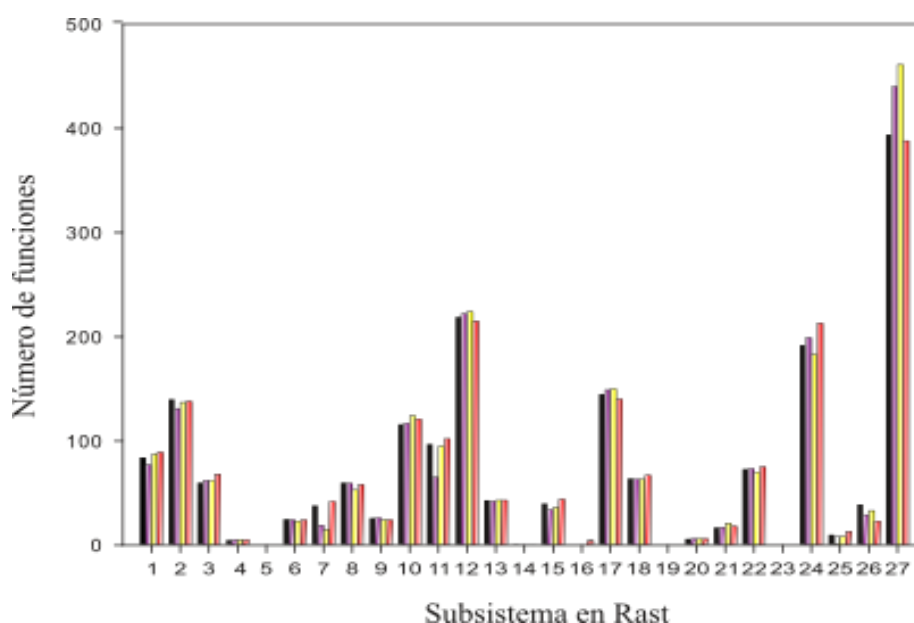
**Tabla 13.** Características generales de los aislamientos de *Enterococcus* y comparativa con cepas representativas dentro del género.

Cepa	Genoma (pb)	% G+C	CDSs	ARNs	Numero de acceso
<b>IQ23</b>	3124007	37,7	3069	69	LKPF00000000
<b>GM75</b>	2848961	38,1	2921	92	LKPI00000000
<b>IQ110</b>	2757341	37,9	2714	69	LKPG00000000
<b>GM70</b>	2696915	38,0	2724	65	LKPH00000000
<i>E. faecium</i> TX1330	277797	38,3	2649	59	ACHL00000000.1
<i>E. durans</i> IPLA 655	3059005	38,6	2973	73	AOSM00000000.1
<i>E. mundtii</i> crl1656	3064512	38,6	2765	60	AFWZ00000000.1
<i>E. hirae</i> EnGen0127	2948802	36,9	2782	59	AISM00000000.1
<i>E. villorum</i> ATCC 700913	3058438	35,0	2882	69	AJAN00000000.1
<i>E. ratti</i> DSM 15687	2485659	34,3	2443	43	JXLB00000000
<i>E. faecalis</i> JH2-2	2840305	37,5	2727	51	AEBB00000000.1

De acuerdo a Rast, las cepas IQ110 y GM70 presentan tamaños genómicos similares, aproximadamente 2,7 Mpb cada uno, la cepa GM75 presenta un genoma de mayor tamaño, 2,8 Mpb aproximadamente, y la cepa IQ23 presenta un genoma aún más grande, de 3,1 Mpb. Estas diferencias también se reflejan en el número de CDS que asigna Rast, que oscilan entre 2700 y 3000, siendo la cepa IQ23 quien presenta la mayor cantidad de CDS anotados.

Pese a ello, no observamos grandes diferencias en las rutas metabólicas generales predichas para cada cepa, lo cual se refleja en el número y tipo de funciones

asignadas a los subsistemas especificados por Rast (Fig. 33). Las principales diferencias pudimos observarlas en los subsistemas 7, 11, 24 y 27, que contienen a los elementos genéticos móviles predichos y las funciones putativas responsables de los metabolismos de nucleósidos, nucleótidos, aminoácidos y derivados, y de la utilización de azúcares, respectivamente (Fig. 33).



**Fig. 33. Número de CDS anotados y clasificados en subsistemas para las cepas en estudio.** Las barras negras corresponden a la cepa GM70, las violetas a la cepa GM75, las amarillas a la IQ110 y las rojas a la cepa IQ23. Los subsistemas se enumeran de la siguiente forma: 1. Cofactores, vitaminas, pigmentos y grupos prostéticos, 2. Pared celular y cápsula, 3. Virulencia, enfermedades y defensa, 4. Metabolismo del potasio, 5. Fotosíntesis, 6. Misceláneo, 7. Fagos, profagos, elementos transponibles y plásmidos, 8. Transporte a través de la membrana, 9. Adquisición de hierro y metabolismo, 10. Metabolismo de ARN, 11. Nucleósidos y nucleótidos, 12. Metabolismo de proteínas, 13. División y ciclo celular, 14. Movilidad y quimiotaxis, 15. Regulación y señalización, 16. Metabolismo secundario, 17. Metabolismo de DNA, 18. Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides, 19. Metabolismo del nitrógeno, 20. Esporulación y latencia, 21. Respiración y latencia, 22. Respuesta al estrés, 23. Metabolismo de compuestos aromáticos, 24. Aminoácidos y derivados, 25. Metabolismo del azufre, 26. Metabolismo del fósforo, 27. Carbohidratos.

A continuación, comparamos los tamaños genómicos y el porcentaje de G+C de las cepas de *E. faecium* aisladas en el laboratorio junto con los datos de cepas del grupo *E. faecium* (Tabla 13). A pesar de hallarse fuera del grupo mencionado, se adicionó una cepa representativa de la especie *E. faecalis*, dado que es la mejor estudiada dentro del género. Se tomaron cepas cuyos genomas no se encontraran ensamblados, como los de nuestras cepas. Se evidencia que el tamaño de los genomas de las cepas GM75, GM70 e IQ110 es similar al de la cepa tomadas como representativas de las especies *E. faecium* y *E. faecalis*, encontrándose los mismos entre 2,6 y 2,8 Kpb. El genoma de la cepa IQ23 cae fuera de este rango (3,1 Kpb), asemejándose a los de las cepas de *E. durans*, *E.*

*mundtii* y *E. villorum*. Los valores de porcentajes de G+C, en cambio, oscilan entre 37,5 y 38,6 para todos los casos.

Considerando la diferencia en el tamaño genómico (y por consiguiente en el número de CDS) de la cepa IQ23 respecto de los genomas de los demás aislamientos, repetimos el análisis de identidad del gen de ARNr 16S para ésta cepa. A su vez, adicionamos al análisis las secuencias de 7 genes constitutivos para *E. faecium* (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *sodA*, *ddlA*, *ileS* y *alaS*; Coenye y Vandamme, 2003; Douillard y de Vos, 2014). Para ello, extrajimos las secuencias de dichos genes y con las mismas realizamos un blastn sobre las bases de datos nr/nt y WGS. Se especificó la búsqueda dentro del género *Enterococcus* y se obtuvieron los siguientes resultados.

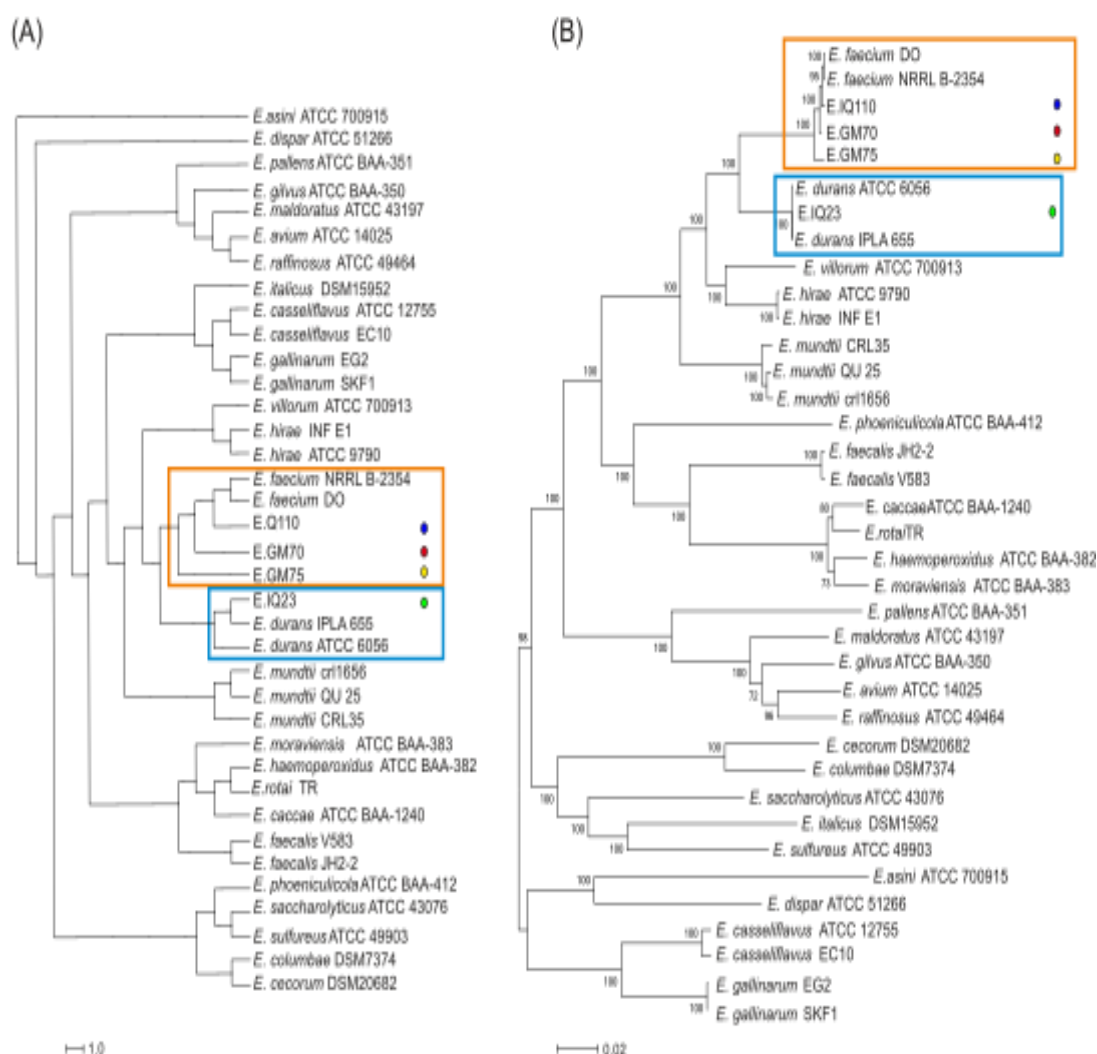
Para el gen del ARNr 16S se encontró un 99% identidad tanto con el mismo gen de cepas de *E. faecium*, como con los de cepas pertenecientes a *E. durans*, *E. mundtii* y *E. hirae*. Se encontró también un 99 % de identidad con cepas filogenéticamente más alejadas como algunas de *E. faecalis*, lo que indica la alta conservación de la secuencia de este gen y la baja sensibilidad que posee para ser utilizado en la tipificación de especies muy relacionadas (Espariz et al., 2016).

Para el resto de los genes constitutivos de la cepa IQ23 utilizados en la búsqueda, Blastn arrojó un resultado del 100% de identidad con aquellos pertenecientes a la cepa IPLA 655 de *E. durans*. Mientras que con las cepas de *E. faecium*, los mismos poseían un porcentaje de identidad no superior al 86%.

Estos resultados estarían indicando que la cepa IQ23 no pertenecería a la especie asignada previamente utilizando el gen del ARNr 16S, sino que pertenecería a la especie *E. durans*.

Para ratificar esta hipótesis, se procedió a realizar el análisis filogenético correspondiente, por medio de la generación de árboles. Por un lado, se tomaron las secuencias genómicas de cepas representativas de las especies que conforman el género *Enterococcus* (cuya especie se encuentra confirmada, extraídas de la base de datos de EzGenome, [http:// www. ezbiocloud.net/ ezgenome /browse\\_db](http://www.ezbiocloud.net/ezgenome/browse_db)) y se compararon por medio del software Gegenees (Ågren et al., 2012) con nuestros cuatro aislamientos. El resultado que arroja el programa es un mapa de calor, es decir, un

arreglo bidimensional simétrico que contiene valores porcentuales. Éstos determinan el grado de similitud entre dos genomas y se utilizan para inferir relaciones filogenéticas. Es decir, a mayor grado de similitud, mayor será el grado de cercanía entre dos especies y más cercano a 100 será el valor calculado por el programa. Los resultados contenidos en esta matriz de calor, pueden también representarse gráficamente como un árbol filogenético. En la Fig. 34A se encuentra el árbol generado utilizando el método de Neighbor Joining (NJ, (Saitou y Nei, 1987) con el programa SplitsTree versión 4.13.1 para Linux (Huson y Bryant, 2006).





De manera complementaria, se realizó un MLSA (por las siglas en inglés de “Multi Locus Sequence Analysis”, Glaeser y Kämpfer, 2015), seleccionando 33 genes conservados comunes y 36 cepas representativas dentro del género *Enterococcus*. Los genes fueron alineados con clustalW (Thompson et al., 2002), concatenados con el script de Perl catfasta2phym.pl y la secuencia resultante fue depurada con Gblock 0.91b. A continuación, utilizando Mega 5 (Tamura et al., 2011) se infirió la historia evolutiva y se construyó un árbol con el mayor log (likelihood) (Fig. 34B). En ambos árboles podemos observar una clara separación de nuestras 4 cepas entre dos grupos. La cepa GM75 (círculo amarillo), la IQ110 (círculo azul) y la GM70 (círculo rojo) agrupan junto a las cepas representantes de la especie *E. faecium* (*E. faecium* DO y NRRL-B2354), mientras que la IQ23 (círculo verde) agrupa junto a las cepas pertenecientes a la especie *E. durans* (IPLA 655 y ATCC 6056).

A su vez, se calcularon los valores de ANI (del inglés “Average Nucleotide Identity”, (Goris et al., 2007) y de hibridación DNA-DNA *in silico* (HDDis; Meier-Kolthoff et al., 2013). Estos cálculos se realizan sobre dos secuencias comparadas y permiten determinar, respecto de un valor umbral, si dos cepas pertenecen a una misma especie. Los valores de ANI se calcularon utilizando el programa Jspecies 1.2.1 (Richter y Rossello-Mora, 2009) y cepas pertenecientes al grupo *E. faecium*. Valores de ANI superiores a 94 indicarían que las cepas comparadas pertenecen a la misma especie (Konstantinidis y Tiedje, 2005). Los valores de HDDis fueron estimados por medio de Genome Blast Distance Phylogeny (GBDP) 2.0 Web server (<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>) utilizando la fórmula 3 para secuencias completas. Valores de HDDis mayores a 70% para un par de cepas dadas indicarían pertenencia a una misma especie (Goris et al., 2007). Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Considerando que los árboles contruidos contienen a todas las especies confirmadas de *Enterococcus* (identificadas hasta el año 2016) y teniendo en cuenta los valores de ANI y de HDDis obtenidos, concluimos que la asignación de especies para las cepas GM70, GM75 e IQ110 es correcta y *E. faecium*, mientras que la cepa IQ23 debe ser reasignada como *E. durans*. Cabe destacar que, a pesar de que para la cepa GM75 los valores calculados superan los establecidos como umbral, estos son notoriamente más bajos que los estimados para las demás cepas de *E. faecium* entre sí. Esto, junto a

los datos de la Tabla 13 para la cepa, podría ser un indicio de una posible subdivisión dentro de la especie *E. faecium*.

**Tabla 14.** Valores de HDDis y ANI para las cepas IQ23, GM75, IQ110 y GM70 en relación a cepas seleccionadas dentro del género *Enterococcus*.

Especie		GM70		GM75		IQ110		IQ23	
		% HDDis	ANI	% HDDis	ANI	% HDDis	ANI	% HDDis	ANI
-	GM70	---	---	72 ± 3	95,1	82 ± 3	98,5	22 ± 3	79,4
	GM75	72 ± 3	95,2	---	---	75 ± 3	94,8	21 ± 3	78,5
	IQ110	82 ± 3	98,5	75± 3	94,8	---	---	21 ±3	78,1
	IQ23	22 ± 3	79,3	21 ± 3	78,4	21 ± 3	78	---	---
E. faecium	DO	80 ± 3	98,9	70 ± 3	94,8	84 ± 3	98,9	20± 3	77,3
	NRRL- B2354	82 ± 3	98,6	70 ± 3	94,7	88 ± 3	98,9	20 ± 3	77,1
E. durans	ATCC 6056	22± 3	78,8	21 ± 3	78,5	20 ± 3	77,4	89 ± 3	99,3
	IPLA 655	22 ± 3	78,9	21 ± 3	78,6	21 ±3	78,2	96 ± 2	99,9
E. villorum	ATCC 700913	18 ± 3	76,5	19 ± 3	76,4	18 ± 3	76,4	24 ± 2	78,8
E. hirae	ATCC 9790	19 ± 3	76,4	19 ± 3	76,4	19 ± 3	76,7	22 ± 3	78,3
	INF E1	19 ± 3	76,6	19 ± 3	76,4	19 ± 3	76,6	22 ± 3	78,3
E. mundtii	CRL35	17 ± 3	75,9	17 ± 3	75,5	17 ± 3	75,5	22 ± 2	76,4
	QU 25	17 ± 3	75,7	17 ± 3	75,4	17 ± 3	75,4	22 ± 2	76,1
	crl2656	16 ± 3	75,9	17 ± 3	75,4	16 ± 3	75,5	23 ± 2	76,3

## Propiedades de interés industrial

A pesar de que la utilización de enterococos de manera intencionada en la industria alimenticia es controversial, estas bacterias están naturalmente presentes en los productos lácteos contribuyendo de manera positiva en los procesos fermentativos.

De hecho, en los últimos años dos cepas de *E. durans* con propiedades probióticas han sido aisladas de cremas tradicionales chinas (Guo et al., 2016), mientras que varias de *E. faecium* se usan desde hace ya tiempo con esa finalidad (Benyacoub et al., 2003; EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2012; Sun et al., 2010).

Con la intención de localizar toda función putativa que pueda interesar a la industria o bien fundamente un potencial uso, así como pueda también llegar a impedirlo, examinamos los genomas de las 4 cepas en estudio. De este modo y junto con otros datos fenotípicos podríamos dirigir una selección racional de cepas con capacidades metabólicas relevantes para la industria alimenticia.

### Azúcares

Inicialmente nos enfocamos en la utilización de azúcares, ya que el perfil metabólico de los mismos es de gran importancia en los cultivos adjuntos. Para ello identificamos funciones utilizando las anotaciones dadas por Rast y lo complementamos con los resultados de una prueba API (API 50 CH kit, bioMérieux, Francia). Los resultados generales se presentan en la Tabla 15. A continuación detallamos las funciones encontradas para cada carbohidrato en particular.

La capacidad de una BAL para incorporar y utilizar lactosa es una característica esencial para aquellas bacterias destinadas a la fermentación de leche. Las pruebas API indicaron que todas las cepas son capaces de utilizar D-lactosa, y las predicciones de Rast acompañaron estos resultados (Tabla 15).

En la Tabla 16 se indican los genes relacionados al consumo de lactosa. Tanto para la cepa IQ23 como para las cepas GM70 e IQ110 encontramos el gen codificante del represor LacR, así como todo el operón *lacABCD* y los tres componentes del sistema de fosfotransferasa responsable de la incorporación de lactosa a la célula (Tabla 16).

Mientras que RAST también anota todas estas funciones para la cepa GM75, una inspección detallada de las mismas nos reveló que se tratan de secuencias truncadas o incompletas. Es decir, que no serían funcionales los genes PTS ni los genes *lac* degradativos que permitirían la posterior conversión a tagatosa (función común en BAL) en la cepa GM75. No obstante, todas las cepas poseen el gen de al menos una

permeasa de lactosa (*lacS* para las cepas de *E. faecium* y *lacY* para la cepa *E. durans* IQ23). Asimismo, el gen *lacZ* que codifica a la betagalactosidasa responsable de escindir la molécula de lactosa en galactosa y glucosa se encuentra presente en todos los casos. La presencia de estos últimos genes podría explicar la reacción positiva en la prueba API para lactosa para la cepa GM75.

**Tabla 15.** Azúcares fermentables predichos y perfil generado con la prueba API.

Azúcar	Cepa							
	IQ23		GM75		IQ110		GM70	
	Prueba API	Predicción	Prueba API	Predicción	Prueba API	Predicción	Prueba API	Predicción
D-lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+
D-galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+
D-maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinosa	-	-		+	+	+	+	+
D-trehalosa	+	-		-	+	+	+	+
D-fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribosa	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnosa	-	-	-	+		+	-	-

**Tabla 16.** Genes predichos para el consumo de lactosa y galactosa.

Metabolismo específico	Función	Gen	Número EC	Presencia en la cepa			
				IQ23	IQ110	GM70	GM75
Utilización de lactosa	Sistema de transporte de fosfotransferasa (PT) para lactosa	<i>lacEF</i>	EC 2.7.1.207	Sí	Sí	Sí	No
	Regulador del sistema PT	<i>lacR</i>	-	Sí	Sí	Sí	No
	Degradación	<i>lacABCD</i>	EC 5.3.1.26, EC 2.7.1.144, EC 4.1.2.40	Sí	Sí	Sí	No
	Permeasa	<i>lacY</i>	-	Sí	No	No	No
	Permeasa	<i>lacS</i>	-	No	Sí	Sí	Sí
	Betagalactosidasa	<i>lacZ</i>	EC 3.2.1.23	Sí	Sí	Sí	Sí
Utilización de galactosa	Degradación de galactosa	<i>galM, galA, galE, galT, galK and galR</i>	EC 5.1.3.3	Sí	Sí	Sí	Sí

Seguidamente, analizamos el metabolismo de galactosa, asociado directamente con el anterior, cuya reacción en la prueba API fue positiva en todas las cepas.

Encontramos que nuestros enterococos poseían los genes *galM*, *galA*, *galE*, *galT*, *galK* y *galR* (Tabla 15 y Tabla 16), necesarios para dicho metabolismo, lo cual concuerda con la prueba fenotípica.

Por otro lado, la maltosa y las maltodextrinas son azúcares comunes en el tracto gastrointestinal. La utilización de éstas como fuente de carbono es una propiedad relevante en las bacterias comensales, especialmente aquellas probióticas. La reacción en la prueba de API para maltosa fue positiva para las cuatro cepas, lo cual puede deberse a la presencia de los genes *malT*, *malB*, *malM*, *malP* y *malR* (Joyet et al., 2017; Mokhtari et al., 2013; Sauvageot et al., 2017; Tabla 15 y Tabla 17).

**Tabla 17.** Genes predichos para el consumo de maltosa y maltodextrinas

Metabolismo específico	Función	Gen	Número EC	Presencia en la cepa			
				IQ23	IQ110	GM70	GM75
Utilización de maltosa y maltodextrinas	Sistema de transporte ABC	<i>malEFG</i>	-	Sí	Sí	Sí	Sí
	Proteína de utilización de maltodextrinas	<i>malA</i>	-	Sí	Sí	Sí	Sí
	Neopululanasa	<i>aglB</i>	Ec 3.2.1.135	Sí	Sí	Sí	Sí
Utilización de maltosa	Sistema de transporte tipo fosfotransferasa	<i>malT</i>	EC 2.7.1.208	Sí	Sí	Sí	Sí
	Maltosa fosforilasa	<i>malP</i>	EC 2.4.1.8	Sí	Sí	Sí	Sí
	Fosfoglucomutasa	<i>malB</i>	EC 5.4.2.6	Sí	Sí	Sí	Sí
	Aldosa-1-epimerasa	<i>malM</i>	EC 5.1.3.3	Sí	Sí	Sí	Sí
	Regulador transcripcional	<i>malR</i>	-	Sí	Sí	Sí	Sí
	Regulón YcjW	<i>ycjWNOP QRS</i>	-	Sí	Sí	Sí	No

La incorporación y utilización de maltodextrinas también sería posible en todas las cepas a través de los genes *malEFG*, *malA* y el gen codificante para una neopululanasa putativa *aglB*. Adicionalmente las tres cepas de *E. faecium* contienen al regulón YcjW, que también está involucrado en la utilización de maltodextrinas (Tabla 17).

Además se encontraron los genes necesarios para el metabolismo de arabinosa (*araK*, *araD*, *araA*, *araT* y *araR*) en todas las cepas de *E. faecium*, pero no fue el caso

para la cepa IQ23. Estas observaciones concuerdan con el resultado de la prueba de API para L-arabinosa (Tabla 15 y 18).

**Tabla 18.** Genes predichos para el consumo de arabinosa, trehalosa, fructosa y ribosa.

Metabolismo específico	Función	Gen	Número EC	Presencia en la cepa			
				IQ23	IQ110	GM70	GM75
Utilización de fructosa	Sistema de transporte tipo fosfotransferasa	<i>fruAB</i>	EC 2.7.1.202	Sí	Sí	Sí	Sí
	D-fructoquinasa	-	EC 2.7.1.4	Sí	Sí	Sí	Sí
Utilización de arabinosa	Regulador transcripcional	<i>araR</i>	-	No	Sí	Sí	Sí
	Ribulokinasa	<i>araK</i>	EC 2.7.1.16	No	Sí	Sí	Sí
	L-ribulosa-5-fosfato-4-epimerasa	<i>araD</i>	EC 5.1.3.4	No	Sí	Sí	Sí
	Arabinosa isomerasa	<i>araA</i>	EC 5.3.1.4	No	Sí	Sí	Sí
	Transportador	<i>araT</i>	TC 3.A.1.2.2	No	Sí	Sí	Sí
Utilización de ribosa	Riboquinasa	<i>rbsK</i>	EC 2.7.1.15	Sí	Sí	Sí	Sí
	Permeasa	<i>rbsD</i>	TC 3.A.1.2.1	Sí	Sí	Sí	Sí
	Regulador transcripcional	<i>rbsR</i>	-	Sí	Sí	Sí	Sí
Utilización de trehalosa	Sistema de transporte tipo fosfotransferasa	<i>treB</i>	EC 2.7.1.201	Sí	Sí	Sí	Sí
	Hidrolasa	<i>treC</i>	EC 3.2.1.93	Sí	Sí	Sí	Sí
Utilización de ramnosa	Ramnulokinasa	<i>rhaB</i>	EC 2.7.1.5	No	Sí	No	Sí
	L-ramnosa isomerasa	<i>rhaA</i>	EC 5.3.1.14	No	Sí	No	Sí
	Ramnulosa-1-fosfato aldolasa	<i>rhaD</i>	EC 4.1.2.19	No	Sí	No	Sí
	L-ramnosa mutarotasa	<i>rhaM</i>	-	No	Sí	No	Sí
	Regulador transcripcional	<i>rhaR</i>	-	No	Sí	No	Sí

Nuestro análisis reveló que además de estos carbohidratos comunes, todas las cepas serían capaces de usar trehalosa, debido a la presencia de los genes para incorporación de este azúcar vía PTS y de la hidrolasa de trehalosa (Tabla 18). La reacción de la prueba de API resultó positiva para este azúcar en las cuatro cepas (Tabla 15).

También, todas resultaron positivas para el uso de fructosa y ribosa (Tabla 15), lo cual puede asociarse a la presencia de los genes descritos en la Tabla 18.

Finalmente, las cepas IQ110 y GM75 poseen los genes *rha*, pero solo en la primera son funcionales de acuerdo a las pruebas fenotípicas (Tabla 15 y Tabla 18). En

una inspección detallada del contexto de estos genes pudimos comprobar que el gen codificante de la enzima lactaldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.22) se encuentra truncado en la cepa GM75. La actividad que la enzima codifica es importante en los últimos pasos degradativos de la ramnosa (Rodionova et al., 2013). Por otro lado, la permeasa responsable de la incorporación de ramnosa no pudo ser encontrada en ninguna de las dos cepas, aunque si se identificaron los genes para el transportador de ramnogalacturónidos (*rhiABC*) en la cepa IQ110 y GM75, con lo cual, los genes *rha* podrían propiciar la fermentación de ramnosa obtenida a partir de polímeros complejos (Rodionova et al., 2013).

En términos generales se podría decir que las predicciones realizadas por Rast tienen una elevada concordancia con lo observado fenotípicamente, y que esta alta correlación depende de la inspección detallada de cada función predicha.

Como puede apreciarse, las cepas de aisladas de queso tienen la capacidad de metabolizar un amplio grupo de azúcares, que le permitirían subsistir en diferentes ambientes con fuentes de carbono variables. En particular, dado su origen, la capacidad para fermentar lactosa y galactosa en leche es una de las propiedades más relevantes.

### **Proteínas, péptidos y aminoácidos**

Si bien la fermentación de azúcares es necesaria para sustentar el crecimiento de las bacterias lácticas, existe otro metabolismo de igual importancia que es el de proteínas, péptidos y aminoácidos. Como se menciona en la introducción, las proteínas mayoritarias en la leche son las caseínas. Los productos de hidrólisis de caseínas son importantes para la producción de compuestos de aroma en quesos así como para el desarrollo de texturas adecuada (Savijoki et al., 2006; Yvon y Rijnen, 2001).

Procedimos a buscar en los genomas de nuestras cepas genes codificantes de proteinasas, transportadores, permeasas y peptidasas involucrados en la degradación de caseínas. La lista completa de los genes buscados y encontrados se presenta en las Tablas 19 y 20.

La cepa GM70, a diferencia del resto, codifica a una putativa proteinasa de pared celular, similar a las encontradas en BAL (Mozzi et al., 2015), en particular aquellas encontradas en los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Las pruebas de

hidrólisis de caseína en placa resultaron negativas para todas las cepas incluida la GM70.

No obstante, durante la fermentación de leche, el proceso hidrolítico de caseína es llevado a cabo principalmente por los coagulantes (Sousa et al., 2001). La microbiota adventicia, luego puede aprovechar los péptidos o aminoácidos para su posterior degradación.

**Tabla 19.** Funciones predichas por Rast para la hidrólisis de caseínas hasta la obtención de aminoácidos.

Metabolismo específico	Función	Gen	Número EC	Presencia en la cepa			
				IQ23	IQ110	GM70	GM75
Utilización de caseínas	Transportador ABC de oligopéptidos	<i>oppDFBCA</i>	TC 3.A.1.5.1	Sí	Sí	Sí	Sí
	Transportador de di-tripéptidos	<i>dppABCDF</i>	-	Sí	Sí	Sí	Sí
	Proteinasa de pared celular	<i>prt</i>	EC 3.4.21.96	No	No	Sí	No
	Proteína de maduración de Prt	<i>prtM</i>		No	No	No	No
	Transportador de di-tripéptidos	<i>dtpT</i>	-	Sí	Sí	Sí	Sí
	Metionilaminopeptidasa M	<i>pepM</i>	EC 3.4.11.18	Sí	Sí	Sí	Sí
	Alanilaminopeptidasa N	<i>pepN</i>	EC 3.4.11.2	No	No	No	No
	Aminopeptidasa A	<i>pepA</i>	EC 3.4.11.7	Sí	Sí	Sí	Sí
	Pirrolidona carboxipeptidasa	<i>pcP</i>	EC 3.4.19.3	Sí	Sí	Sí	Sí
	Aminopeptidasa C	<i>pepC</i>	EC 3.4.22.40	Sí	Sí	Sí	Sí
	Endopeptidasa G	<i>pepG</i>	EC:3.4.22.-	No	No	No	No
	Endopeptidasa E	<i>pepE</i>	-	No	No	No	No
	Endopeptidasa O	<i>pepO</i>	EC 3.4.24.-	Sí	Sí	Sí	Sí
	Endopeptidasa F	<i>pepF</i>	EC 3.4.24.-	Sí	Sí	Sí	Sí
	Dipeptidasa V	<i>pepV</i>	EC 3.4.13.-	Sí	Sí	Sí	Sí
	Tripeptidasa T	<i>pepT</i>	EC 3.4.11.4	Sí	Sí	Sí	Sí
	Prolinadipeptidasa Q	<i>pepQ</i>	3.4.13.9	Sí	Sí	Sí	Sí
	Prolin aminopeptidasa P	<i>pepP</i>	EC 3.4.11.9	Sí	Sí	Sí	Sí
	Prolinadipeptidasa R	<i>pepR</i>	EC 3.4.13.18	No	No	No	No
	Prolin peptidasa L	<i>pepL</i>	-	No	No	No	No
	Prolin peptidasa I	<i>pepI</i>	EC 3.4.11.5	No	No	No	No
	Prolin peptidasa X	<i>pepX</i>	-	No	No	No	No



**Tabla 20.** Funciones relacionadas al metabolismo de aminoácidos.

Metabolismo específico	Función	Gen	Número EC	Presencia en la cepa			
				IQ23	IQ110	GM70	GM75
	Aminotransferasa de aminoácidos ramificados	<i>bcaT</i>	EC 2.6.1.42	Si	Si	Si	Si
	Aminotransferasa de aminoácidos aromáticos	<i>araT</i>	EC 2.6.1.42	Si	Si	Si	Si
	Alanina aminotransferasa	<i>alaT</i>	EC 2.6.1.21	Si	No	No	No
	Aspartato aminotransferasa	<i>aspT</i>	EC 2.6.1.1	Si	Si	Si	Si
	Glutamato descarboxilasa	<i>gadRCB</i>	EC 4.1.1.15	No	No	Si	No
	Descarboxilasa de alfa cetoácidos ramificados	<i>kdcA</i>	EC 4.1.1.72	No	No	No	No
	Piruvato descarboxilasa	<i>pdh</i>	Ec 4.1.1.1	No	No	No	No
	Glutamato						
<b>Metabolismo de aminoácidos</b>	deshidrogenasa NADP-dependiente	-	EC 1.4.1.4	Si	Si	Si	Si
	Descarboxilasa para aminoácidos ramificados	<i>bkdHAB</i> <i>CD</i>	EC 1.2.4.4	No	No	No	No
	Alcohol deshidrogenasa	<i>adh</i>	EC 1.1.1.1	No	No	No	No
	Alcohol/Aldehído						
	deshidrogenasa bifuncional	<i>adhE</i>	EC 1.2.1.10	Si	Si	Si	Si
	Piruvato deshidrogenasa	<i>pdh</i>	EC 1.2.4.1	Si	Si	Si	Si
	Hidroxiácido deshidrogenasa	<i>hdhD</i>	EC 1.1.1.-	No	No	No	No
	Hidroxiácido deshidrogenasa	<i>hdhL</i>	EC 1.1.1.-	No	No	No	No
	Aspartoquiinasa	<i>aspk</i>	EC 2.7.2.4	Si	Si	Si	Si
	Glutamato-5-quinasa	<i>gluk</i>	EC 2.7.2.11	Si	Si	Si	Si
	Cistationina $\beta$ liasa	-	EC 4.4.1.8	Si	No	Si	No
	Cistationina $\gamma$ liasa	-	EC 4.4.1.1	No	No	No	No

Por otro lado, en *L. lactis*, la proteinasa requiere de una proteína activadora de maduración, codificada por el gen *pmtM* (Vos et al., 1989). No pudimos encontrar codificado un gen con homología a este último en la cepa GM70. La Tabla 19 presenta

la lista con las funciones necesarias para la hidrólisis de caseína hasta la obtención de aminoácidos detectadas por medio de Rast.

En la Tabla 20 se analizaron las rutas degradativas de aminoácidos que conducirían a la producción de compuestos de aroma. Se buscaron los genes putativos codificantes de aminotransferasas, descarboxilasas, deshidrogenasas y liasas de aminoácidos y derivados (Tabla 20).

En todas las cepas encontramos diversas transaminasas, entre las que podemos mencionar a la de aminoácidos de cadena ramificada y la de aromáticos. Estas son especialmente importantes ya que inician la degradación de los principales aminoácidos generadores de aroma y sabor. También, encontramos anotadas varias aminotransferasas de ácido aspártico y de alanina, para la cepa IQ23. No obstante, de acuerdo a los resultados de la búsqueda en BLAST de estos genes, podrían estar cubriendo transferencias de grupos amino sobre otros aminoácidos.

Dentro de las descarboxilasas, encontramos en la cepa GM70 la glutamato descarboxilasa GluDC, ausente en los demás enterococos. Por otro lado, la descarboxilasa de los  $\alpha$ -cetoácidos generados a partir de aminoácidos ramificados no pudo encontrarse. Sin embargo, ha sido descrito para *L. lactis*, que la enzima piruvato deshidrogenasa estaría implicada en la descarboxilación oxidativa de los aminoácidos aromáticos y los de cadena ramificada (Yvon y Rijnen, 2001).

A su vez, detectamos en las cepas GM70 e IQ23 el gen codificante para una cistationina  $\beta$  liasa, que podría producir metanotiol, lo cual les otorgaría una ventaja por sobre las demás cepas respecto de la generación de aroma

### **Actividades lipasa y esterasa**

Las actividades esterasa y lipasa son importantes en la generación de sabor y aroma en los quesos principalmente por medio de la hidrólisis de las grasas presentes en la leche, pero también por rutas alternativas como las de alcoholisis (Holland et al., 2005).

Los ácidos grasos libres pueden proveer a los lácteos de los típicos sabores “a queso”, mientras que los ésteres generan notas más frutales, que suelen enmascarar los sabores desagradables de los ácidos grasos de cadena corta. La búsqueda entre las anotaciones de RAST nos llevó a encontrar cuatro, tres, tres y dos esterasas en las cepas

IQ23, IQ110, GM75, y GM70, respectivamente. En todas, uno de estos genes está anotado como una tributirinesterasa (Tabla 22), con un alto porcentaje de identidad con el gen *estA* de *E. faecium* DO (PRJNA55353). No obstante, la prueba fenotípica de hidrólisis de tributirina (ver materiales y métodos) no arrojó resultados concluyentes. Además, también se encuentran anotadas cuatro lipasas en las cepas de *E. faecium* y 3 para la cepa de *E. durans*.

### Metabolismo del citrato y piruvato

En la Tabla 21 se detallan los genes anotados por Rast relacionados a la degradación de piruvato y citrato. Como se confirmó en el capítulo dos, todas las cepas pueden convertir piruvato en acetoina y diacetilo gracias a la presencia de los genes *alsS* y *alsD*. El gen *alsR* descrito para *B. subtilis* que codifica para un regulador del operón *alsSD* (Frädrich et al., 2012) no pudo ser encontrado en las cepas de enterococos. Además, a diferencia de *L. lactis*, tampoco pudimos encontrar los genes *butAB* que permitirían la obtención del compuesto 2,3-butanodiol.

Asimismo, tal como se describe en el capítulo anterior, los genes necesarios para la fermentación de citrato solo fueron identificados en las cepas GM75, IQ23 y GM70 (Tabla 21).

### Tolerancia a sales biliares y bacteriocinas

En las cepas de *E. faecium* encontramos anotada una enzima cuya función está directamente relacionada a la supervivencia en el tracto gastrointestinal, que es la Coloilglicil hidrolasa, también denominada enzima BSH (por las siglas de la expresión inglesa correspondiente a “hidrolasa de sales biliares”). Esta enzima, no solo está relacionada a la supervivencia en medios que contengan estas sales, sino que también está asociada con la disminución del colesterol en el hospedador de la bacteria (Choi et al., 2015; Jones et al., 2013; Tsai et al., 2014).

A pesar de que esta función no se encontró en la cepa IQ23, se halló la enzima ciclopropanoacilfosfolípido sintasa, presente a su vez en el resto de las cepas, que proveería de una tolerancia a las sales biliares.

Por otro lado, RAST anota varias bacteriocinas en los genomas analizados. Estas pequeñas proteínas o péptidos son capaces de inhibir el crecimiento de patógenos y

modular la composición de la microbiota intestinal. En consecuencia, pueden también modular el sistema inmune del hospedador (Dobson et al., 2012). De hecho, encontramos un precursor de bacteriocina tipo P, una putativa colicina V y una enterocina tipo carnobacteriocina BM1, en todas las cepas. A éstas se le suma una bacteriocina más para las cepas de *E. faecium* y tres para la de *E. durans*, que no tiene homología con otras bacteriocinas comunes.

**Tabla 21.** Funciones detectadas relacionadas al metabolismo de piruvato y citrato.

Metabolismo específico	Función	Gen	Número EC	Presencia en la cepa			
				IQ23	IQ110	GM70	GM75
Metabolismo de piruvato	Piruvato deshidrogenasa	<i>pdh</i>	EC 1.2.4.1	Si	Si	Si	Si
	Lactato deshidrogenasa	<i>ldh</i>	EC 1.1.1.27	Si	Si	Si	Si
	Acetolactato sintasa	<i>alsS</i>	EC 2.2.1.6	Si	Si	Si	Si
	Acetolactato descarboxilasa	<i>alsD</i>	EC 4.1.1.5	Si	Si	Si	Si
	Regulador transcripcional	<i>alsR</i>	-	No	No	No	No
	2,3-butanodiol deshidrogenasa	<i>butBA</i>	EC 1.1.1.4, EC 1.1.1.304	No	No	No	No
Metabolismo de citrato	Operón fermentativo de citrato	<i>citMPCDEFXG</i>	EC 4.1.1.3, EC 4.1.1.6	Si	No	Si	Si
	Regulador	<i>citI</i>	-	Si	No	Si	Si

### Aminas biogénicas

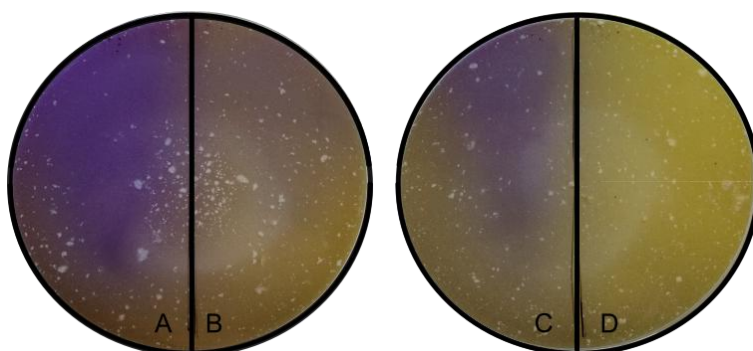
Así como existen ciertas actividades metabólicas deseadas en las cepas a ser utilizadas en la industria alimenticia, existen también aquellas indeseadas. Una de ellas es la de producción de aminas biogénicas.

Como se mencionó en la introducción, estos derivados aminoácidos generan malestares cuando son consumidos, y por lo tanto su generación tiende a minimizarse.

Las aminas biogénicas más comunes son aquellas producidas a partir de histidina, lisina, ornitina y tirosina. Todas ellas poseen vías anabólicas estudiadas

ampliamente y son comúnmente encontradas en BAL (Lonvaud-Funel, 2001; Pessione and Cirrincione, 2016; Spano et al., 2010; Suarez et al., 2012). Para el caso de nuestras cepas solo fuimos capaces de encontrar codificada la ruta completa para la formación de tiramina a partir de tirosina (Tabla 22).

Con el objeto de confirmar la capacidad de producción de tiramina, se utilizó una modificación del medio de Bover-Cid y Holzapfel para detección de actividades descarboxilasas (Bover-Cid y Holzapfel, 1999).



**Fig. 35. Detección de actividad tirosina descarboxilasa.** A) Cepa IQ110; B) cepa GM70, C) cepa IQ23 y D) cepa GM75. La coloración violácea indica una reacción positiva de descarboxilación de tirosina, mientras que la coloración amarilla un resultado negativo.

Como se observa en la Fig. 35, las cepas IQ110 e IQ23 dieron resultados positivos (coloración violácea), la GM70 dio un resultado intermedio mientras que la cepa GM75 no modificó el indicador de pH, permaneciendo la coloración amarilla del medio.

Pese a que todas las cepas poseen los genes para la generación de tiramina (Tabla 22), la diferencia en la expresión génica y/o en las capacidades degradativas, pueden generar diferencias en un medio selectivo sencillo como el utilizado, impidiendo la correcta detección de la actividad descarboxilasa. Más estudios serán necesarios para confirmar tal actividad, mediante el uso de técnicas más sensibles. No obstante, la descarboxilación de tirosina es una característica común de los enterococos (Bargossi et al., 2015; Ladero et al., 2012; Perez et al., 2017; Suarez et al., 2012). En particular en *E. faecium* se ha demostrado como un mecanismo de homeostasis de pH celular, dado que la reacción consume protones intracelulares, alcalinizando el citoplasma (Pereira et al., 2009). Desde el punto de vista tecnológico, la supervivencia a pH bajo es una

característica relevante en los enterococos que crecen mayormente en etapas tardías de la producción de los quesos.

**Tabla 22.** Funciones detectadas para actividades esterasa y producción de aminas biogénicas

Propósito específico	Función	Gel	Número EC	Presencia			
				IQ23	IQ110	GM70	GM75
<b>Lipólisis</b>	Esterasa	<i>estA</i>	EC 3.1.1.1	Si	Si	Si	Si
<b>Producción de tiramina</b>	Tirosil-tARN sintetasa	<i>tyrRS</i>	EC 6.1.1.1	Si	Si	Si	Si
	Tirosina descarboxilasa	<i>tyrDC</i>	EC 4.1.1.25	Si	Si	Si	Si
	Permeasa de tirosina	<i>tyrP</i>	-	Si	Si	Si	Si
	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiportador	<i>nhaC</i>	-	Si	Si	Si	Si
<b>Producción de putrescina</b>	Ornitina descarboxilasa	<i>odc</i>	EC 4.1.1.17	No	No	No	No
	Agmatina deiminasa	<i>aguA</i>	EC 3.5.3.12	No	No	No	No
	Putrescina carbamoil transferasa	<i>aguB</i>	EC 2.1.3.6	No	No	No	No
	Carbamato quiinasa	<i>aguC</i>	EC 2.7.2.2	No	No	No	No
	Agmatina/putrescina antiportador	<i>aguD</i>	-	No	No	No	No
	Regulador transcripcional	<i>aguR</i>	-	No	No	No	No
<b>Producción de histamina</b>	Histidina descarboxilasa	<i>hdcA</i>	EC 4.1.1.22	No	No	No	No
	Permeasa de histidina	<i>hdcP</i>	-	No	No	No	No
	Histidil-tARN sintetasa	<i>hisRS</i>	-	No	No	No	No
	Proteína de maduración de la histidina descarboxilasa	<i>hdcB</i>	-	No	No	No	No
<b>Producción de cadaverina</b>	Lisina descarboxilasa	<i>cadA</i>	EC 4.1.1.18	No	No	No	No
	Lisina/cadaverina antiportador	<i>cadB</i>	-	No	No	No	No

### Estabilidad genómica: secuencias de inserción, profagos, CRISPR, islas genómicas y plásmidos

Las secuencias de inserción (IS, del respectivo término inglés), los transposones, los plásmidos y profagos, así como otros elementos móviles (por ejemplo, las islas genómicas o elementos conjugativos) proveen de variabilidad genómica y son en sí mismos mediadores en la transferencia horizontal de genes y reorganizaciones genómicas. La capacidad de una cepa para tomar o transferir secuencias de ADN, tendrá un impacto directo en la estabilidad de su genoma. Esta última, es una

característica altamente deseable en las cepas de interés para la industria alimenticia. Al mismo tiempo, la plasticidad genómica de una cepa establecerá diferencias con las demás, lo cual podría resultar en una ventaja o una desventaja.

A continuación describimos los elementos móviles encontrados en los genomas de los enterococos aislados.

### Secuencias de inserción

Inicialmente, realizamos una búsqueda de IS putativas utilizando las herramientas descritas en materiales y métodos. Los resultados para las IS halladas se muestran en la Tabla 23.

**Tabla 23.** Secuencias de inserción detectadas en las cepas IQ23, GM75, IQ110 y GM70.

Cepa	IS predicha	Estado	% G+C	Familia	Aislada originalmente de
IQ23	ISEfa7	Completa	39	IS1182	<i>E. faecium</i>
	ISEf1	Completa	35	IS256	<i>E. faecalis</i>
	IS1252	Completa	40	IS30	<i>Enterococcus sp.</i>
	IS1485	Incompleta	38	IS3	<i>E. faecium</i>
	ISEfa13	Completa	32	IS256	<i>E. faecium</i>
GM75	IS* (dos copias)	Incompleta	39;40	IS6	<i>L. lactis</i>
	ISEfm2	Completa	39	IS256	<i>E. faecium</i>
	ISEnfa4	Completa	39	IS256	<i>E. faecalis</i>
	ISEfm1 (dos copias)	Completa	35	IS982	<i>E. faecium</i>
IQ110	ISLgar5	Completa	43	IS256	<i>L. garvieae</i>
	IS*	Completa	36	ISL3	<i>E. faecium</i>
	ISEfm1 (dos copias)	Completa	35	IS982	<i>E. faecium</i>
	ISLpl1	Incompleta	41	IS30	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	IS* (dos copias)	Incompleta	39	IS6	<i>L. lactis</i>
GM70	IS1251	Completa	38	ISL3	<i>E. faecium</i>
	ISLgar5	Completa	43	IS256	<i>L. garvieae</i>
	IS1062	Completa	35	IS30	<i>E. faecalis</i>
	ISEfm2	Completa	39	IS256	<i>E. faecium</i>
	ISEfa10	Completa	39	IS3	<i>E. faecium</i>
	IS *	Completa	37	IS6	<i>L. lactis</i>
	ISEfm1	Completa	35	IS982	<i>E. faecium</i>
	ISEfa7	Completa	39	IS1182	<i>E. faecium</i>
	IS1252	Completa	40	IS30	<i>Enterococcus sp.</i>
	IS1485	Completa	38	IS3	<i>E. faecium</i>

La cepa GM70 se presenta como aquella con mayor número de IS completas detectadas (10) mientras que la cepa IQ23 es la que posee el menor número (5). Todas las secuencias detectadas pertenecen a familias cuyos orígenes se encuentran en los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus* (Tabla 23). Cabe destacar que la secuencia IS16 utilizada como marcador de cepas asociadas a clínica (Werner et al., 2011) no fue hallada en ninguno de los casos.

### Profagos

Nos interesó determinar la presencia de fagos integrados en los genomas de nuestras cepas. Como se aprecia en la Tabla 24 la cepa IQ23 presenta el mayor número de profagos predichos, un total de 6, mientras que en las cepas de *E. faecium* se predican tan solo 3 a cada una.

**Tabla 24.** Profagos predichos para las cepas IQ23, GM75, GM70 e IQ110

Cepa	Región	Estado	% G+C	Número de CDS	Tamaño de la región (Kb)
IQ23	1	Cuestionable	38	22	35.2
	2	Incompleto	37	30	15.5
	3	Intacto	37	51	36
	4	Intacto	40	42	38.1
	5	Incompleto	36	30	22.6
	6	Intacto	38	35	30.2
GM75	1	Intacto	37	55	42.3
	2	Intacto	36	67	39.7
	3	Cuestionable	37	28	40.3
IQ110	1	Cuestionable	35	22	18.5
	2	Intacto	37	53	43.6
	3	Incompleto	36	40	25.4
GM70	1	Intacto	37	42	34.4
	2	Intacto	36	42	40.6
	3	Intacto	37	46	41.2



### Locus CRISPR-Cas

También inspeccionamos los genomas en búsqueda de loci CRISPR-*cas*. Estas regiones no solo proveen a la cepa portadora de la habilidad para defenderse de moléculas extrañas de ADN, sino que, para el caso de los enterococos, se las sugiere como marcadoras de cepas sensibles a antibióticos (Palmer y Gilmore, 2010), dado que la mayoría de los genes de resistencia se adquieren por medio de elementos genéticos móviles, los cuales podrían ser evitados por estas secuencias CRISPR.

Utilizando el servicio web mencionado en materiales y métodos, fuimos capaces de detectar una secuencia putativa CRISPR, formada por tres repeticiones directas de 24 pb y tres espaciadores. No obstante estas secuencias fueron halladas contenidas dentro de un putativo gen codificante de una proteína Rep. Considerando que no pudimos encontrar secuencias codificantes de proteínas Cas próximas a dichas repeticiones, concluimos que las secuencias predichas no corresponderían a CRISPRs.

Complementariamente, RAST anota para la cepa IQ23 cinco genes putativos codificantes de proteínas Cas. Dichos genes tienen una organización similar a aquella descrita para las regiones CRISPR-Cas del subtipo Nmeni (Haft et al., 2005). No obstante, no encontramos secuencias palindrómicas cercas de estos genes. Realizando un apilamiento de esta región con las mismas de otras cepas de *E. durans*, revelamos una delección de 94 pb de bases debajo de estos loci (no mostrado). Esta delección podría haber afectado a probables secuencias palindrómicas que hubiesen conformado un locus CRISPR-Cas en la cepa IQ23.

### Islas genómicas

Nos interesó estudiar la presencia de islas genómicas (GEI) en las cepas de enterococos. En particular aquellas de patogenicidad, que pudieran indicar algún tipo de peligrosidad de nuestros aislamientos para un potencial uso en la industria alimenticia.

Utilizando la herramienta web IslandViewer (Dhillon et al., 2015) pudimos detectar varias islas putativas en cada genoma. Es importante destacar, que esta aplicación web detecta regiones con características particulares dentro de los genomas, tales como zonas con una frecuencia diferente en el uso de codones o sitios de

integración entre genes de ARNt/ARNtm, y las asigna como posibles GEI. En ninguna de las islas detectadas encontramos genes de resistencias antibióticas o de virulencia.

Para la cepa GM75, IslandViewer fue capaz de encontrar trece GEI putativas, con tamaños de entre 3 a 23 Kpb. Dentro de estas islas pudimos encontrar codificados tanto elementos genéticos móviles como, proteínas fágicas, genes de catabolismo de aminoácidos, proteínas ribosomales, transportadores de metales, del metabolismo de lactosa y enterocinas.

En *E. faecium* IQ110 se predijeron nueve GEI, con tamaños desde los 2 a los 36 Kpb. En estas islas también se encontraron elementos genéticos móviles, secuencias fágicas y genes de proteínas ribosomales. En particular encontramos genes relacionados a resistencia a estrés oxidativo y de utilización de azúcares o sus derivados. También encontramos una putativa RepB y el gen codificante de la enzima BSH.

Para la cepa GM70 se predijeron ocho islas de tamaños variables entre 2 y 33 Kb. Nuevamente, dentro de éstas se encontraron genes codificantes de proteínas ribosomales, diferentes tipos de transportadores de ácidos orgánicos y metales, genes relacionados al metabolismo de aminoácidos y de azúcares, al mismo tiempo que detectamos el gen para una proteína Rep y un precursor de enterocina tipo P.

Por último, en el genoma de la cepa IQ23 se predijeron un menor número de GEIs, cinco en total, cuyos tamaños van desde los 6 a los 32 Kpb. La mayoría de las proteínas codificadas en estas islas también son ribosomales, relacionadas a fagos o a metabolismos específicos de azúcares o aminoácidos. A diferencia de las cepas de *E. faecium*, encontramos sistemas toxina-antitoxina (épsilon/zeta, MazE/MazF). Por otro lado, también se describen genes *rep* y de bacteriocinas.

### Plásmidos

Examinando las cepas de enterococos secuenciadas y disponibles en las bases de datos, observamos que las pertenecientes al grupo *E. faecium* son portadoras de múltiples plásmidos, muchos de los cuales poseen tamaños superiores a los 150 Kpb, denominados megaplásmidos (Freitas et al., 2010; Kopit et al., 2014; Rosvoll et al., 2012). En la Tabla 25 se ilustra lo anterior con cepas representativas de las especies *E. faecium* y *E. durans*, cuyos genomas se encuentran completamente ensamblados. La cepa *E. faecium* DO (o TX16, Qin et al., 2012) posee 3 plásmidos, mientras que las cepas

NRRL-B2354 (Kopit et al., 2014) y T110 (Natarajan y Parani, 2015) tan solo uno. No obstante, el plásmido 3 de la cepa DO y el único de la NRRL-B2354 son megaplásmidos, ambos con tamaños superiores a los 200.000 pb. La cepa T110, posee un plásmido de menor tamaño (44,1 Kpb).

La cepa de *E. durans* KLDS 6,0933 posee dos plásmidos, uno de ellos con más de 150.000 pb, mientras que la cepa BDGP3 posee tan solo uno de menor tamaño.

Por otro lado si observamos los porcentajes de G+C de los cromosomas son siempre superiores al 38%, mientras que los plasmídicos no alcanzan el 37% , pudiendo ser tan bajos como 32,9% (Tabla 25).

**Tabla 25.** Información disponible en NCBI de las secuencias genómicas y plasmídicas de cepas representativas de las especies *E. faecium* y *E. durans*.

Cepa	Replicón	Nombre	Número de acceso	Tamaño (Mb)	% G+C
<i>E. faecium</i> DO	Cromosoma	-	017960.1	2,70	38,2
	Plásmido	1	017961.1	0,04	36,5
	Plásmido	2	017962.1	0,07	34,4
	Plásmido	3	017963.1	0,25	36,0
<i>E. faecium</i> NRRL-B2354	Cromosoma	-	020207.1	2,64	38,0
	Plásmido	pNB2354_1	020208.1	0,21	36,0
<i>E. faecium</i> T110	Cromosoma	-	CP006030.1	2,69	38,5
	Plásmido	pEFT110	CP006031.1	0,04	35,8
<i>E. durans</i> KLDS 6,0933	Cromosoma	-	CP012366.1	2,87	38,0
	Plásmido	sin nombre 1	CP012367.1	0,16	35,5
	Plásmido	sin nombre 2	CP012368.1	0,04	35,3
<i>E. durans</i> BDGP3	Cromosoma	-	CP022930.1	2,98	38,0
	Plásmido	pEdBDGP3A	CP022931.1	0,006	32,9

Debido a la alta frecuencia y diversidad de plásmidos presentes en las cepas del grupo *E. faecium*, utilizamos varias estrategias para intentar aislar y detectar potenciales secuencias plasmídicas dentro de los genomas secuenciados de nuestras. Durante la extracción de ADN tales secuencias (especialmente las de megaplásmidos) podrían haber sido aisladas y, en consecuencia, haber sido secuenciadas en conjunto con el ADN cromosomal.

Inicialmente, buscamos en los genomas de las cuatro cepas en estudio secuencias codificantes de proteínas Rep, utilizando la herramienta web PlasmidFinder (Carattoli et al., 2014). En la Tabla 26 se listan las tres proteínas Rep identificadas por el programa. Con el propósito de determinar si la región de ADN que contenía dichas Rep podría pertenecer originalmente a un plásmido, se aislaron los cóntigos que las contenían y se calculó el porcentaje de G+C de los mismos, los cuales fueron cotejados con el calculado para los genomas enteros.

**Tabla 26.** Lista de proteínas Rep predichas

Proteína Rep predicha	Cepa	Identidad con la base de datos (%)	Contenido de G+C del cóntigo (%)	También presente en
RepUs15	GM70	98,94	35,1	<i>E. faecium</i> NRRL-B2354 plásmido
	GM75	98,66	35,8	pNB2354_1;
	IQ110	98,46	35,5	<i>E. faecium</i> DO plásmido 3;
	IQ23	98,85	35,5	<i>E. durans</i> KLDS6.0930 y 6.0933 plásmido 1
Rep18	GM70	99,79	32,1	<i>E. faecium</i> E39 plásmido 5
	IQ23	99,89	32,8	
Rep1	GM70	97,10	36,9	<i>E. faecium</i> NRRL-B2354 plásmido pNB2354

En la tabla 26 se muestra el cóntigo original que contiene a la Rep predicha y el contenido de G+C del mismo. El porcentaje de G+C encontrado para el cóntigo que contenía al gen *rep* fue siempre menor (32,1 a 36,9 %) al genómico (37-38 %). Este dato sugiere la posibilidad de que dichas secuencias pertenezcan a plásmidos.

A continuación, buscamos estas mismas proteínas Rep en plásmidos de otras cepas del grupo *E. faecium*. Utilizando BLAST fuimos capaces de localizar la proteína RepUs15 en el megaplásmido pNB2354 de *E. faecium* NRRL-B2354 y en el plásmido 3 de *E. faecium* DO. También en los dos megaplásmidos de las cepas *E. durans* KLDS 6.0930 y 6.0933. La proteína Rep18 pudo ser localizada en el plásmido 5 de la cepa *E. faecium* E39, mientras que la Rep1 contenida también en el megaplásmido pNB23 (Tabla 26).

Además de las Rep encontradas utilizando la aplicación PlasmidFinder, Rast anota en las cuatro cepas otras proteínas Rep diferentes. Analizando el contexto génico de las mismas, encontramos que en la cepa GM70 los genes del metabolismo del citrato se encuentra adyacente a una de estas Rep en un cóntigo de bajo contenido de G+C (Cóntigo 44.1; %G+C: 35,8).

En la cepa IQ23 detectamos la misma situación (en el cóntigo 42; %G+C: 34.8), en tanto que en la GM75 los genes *cit* están aislados en el cóntigo 167 (de 34,7% de G+C). Lo observado podría ser un indicio de la presencia del grupo de genes *cit* en un plásmido. Muchos firmicutes poseen este metabolismo codificado plasmídicamente, tale es el caso de *L. lactis* o *E. faecium* NRRL-B2354.

Luego, realizamos alineamientos individuales de los genomas enteros de nuestras cepas con los plásmidos de cepas representativas de *E. faecium* y *E. durans*, utilizando Mauve (Darling et al., 2004) y Rast. Muchas de las funciones codificadas en los plásmidos de referencia fueron encontradas en los genomas de nuestras cepas. Entre ellas encontramos genes necesarios para la utilización de azúcares, para el metabolismo de citrato, codificantes de bombas de expulsión de drogas, de proteínas Rep, resistencias a estrés oxidativo y enterocinas. De acuerdo a lo descripto previamente, muchas de estas funciones habían sido agrupadas dentro de islas genómicas. Este análisis lleva a la suposición de que las cepas aisladas en nuestro laboratorio poseerían probablemente plásmidos, que como consecuencia de la metodología utilizada para la extracción de ADN (y posiblemente el tamaño de dichos plásmidos) se encontrarían contenidos y mezclados en las secuencias genómicas. A su vez, muchas de las regiones anotadas como GEIs quizás pertenezcan a estos plásmidos.

## Resistencias a antibióticos

La capacidad de las bacterias para mediar la transferencia de ADN obliga a la industria alimentaria a seleccionar cepas que preferentemente no posean resistencias antibióticas. Utilizando pruebas *in vivo* junto a las predicciones *in silico* determinamos la presencia de dichas resistencias en nuestras cepas. Inicialmente realizamos ensayos de resistencias por medio del analizador automático Vitek®2.

Encontramos que las cuatro cepas eran sensibles a la mayoría de los antibióticos comúnmente utilizados en clínica (Tabla 27). No obstante, todas las cepas resultaron resistentes a trimetoprima/sulfametoxazol. Además, las cepas GM70, GM75 e IQ110 poseen una resistencia intermedia a nitrofurantoina y solo en la cepa GM70 se detectó una resistencia intermedia a ciprofloxacina (Tabla 27). La cepa IQ23, en cambio, presentó las menores CIMs para el anterior antibiótico, así como también para levofloxacina, eritromicina y quinupristina/dalfopristina (Tabla 27).

Para el caso de eritromicina, y según las recomendaciones de la caracterización fenotípica para estas cepas, las resistencias intermedias obtenidas debieron ser cambiadas por resistencias completas.

Además de ello, realizamos ensayos de difusión en disco para otros antibióticos comunes no analizados automáticamente, tales como cloramfenicol, fosfomicina y rifampicina. Obtuvimos una resistencia intermedia en las cepas IQ23 e IQ110 para los dos primeros antibióticos, mientras las cepas GM75 y GM70 fueron sensibles. Para rifampicina todas resultaron sensibles.

De manera conjunta, se realizó una búsqueda bioinformática de aquellos genes y funciones anotadas que pudieran estar relacionadas a dichas resistencias. Para ello utilizamos varias herramientas informáticas que aportan datos complementarios: los servicios de ResFinder (Kleinheinz et al., 2014) y CARD (Jia et al., 2017) que predicen resistencias antibióticas por homología con las de su base de datos, anotaciones dadas por Rast y búsqueda con BLAST de genes específicos de interés.

Por medio de ResFinder fuimos capaces de encontrar el gen *msrC* en las cepas Cit<sup>+</sup>. Este gen puede conferir resistencia a lincosamidas (clindamicina) y estreptogramina B (quinupristina). Sin embargo, se encuentra en la mayoría de las cepas de *E. faecium*, patogénicas o no (Nallapareddy et al., 2008). Al mismo tiempo, este tipo de antibióticos no serían efectivos en clínica contra los enterococos, de modo tal que, no deberían ser testeados *in vivo* y las cepas deberían reportarse siempre como resistentes a los mismos (recomendación del CLSI). El sistema Vitek®2 prueba los antibióticos quinupristina y dalfopristina (estreptograminas B y A, respectivamente) en conjunto, que es el tratamiento común al cual las cepas resultan susceptibles (Tabla 27).

**Tabla 27. Lista de resistencias antibióticas probadas in vivo y predichas in silico.** Las pruebas in vivo incluyen el análisis automático por medio del sistema Vitek2 y ensayos de difusión con discos.

Antibiótico probado	Cepa							
	IQ23		GM75		IQ110		GM70	
	CIM/ Fenotipo	Gen putativo	CIM/ fenotipo	Gen putativo	CIM/ fenotipo	Gen putativo	CIM/ fenotipo	Gen putativo
Ampicilina	<2/S	<i>pbp5</i> híbrido	<2/S	<i>pbp5</i> híbrido	<2/S	<i>pbp5</i> híbrido	<2/S	<i>pbp5</i> híbrido
Ciprofloxacina	<0.5/S	bomba de expulsión <i>pmrA</i> o <i>lde</i>	<0.5/S	bomba de expulsión <i>pmrA</i> o <i>lde</i>	<0.5/S	bomba de expulsión <i>pmrA</i> o <i>lde</i>	1/I	bomba de expulsión <i>pmrA</i> o <i>lde</i>
Nitrofurantoina	<16/S	-	64/I	-	64/I	-	64/I	-
Tetraciclina	<1/S	Bomba de expulsión	<1/S	Bomba de expulsión	<1/S	Bomba de expulsión	<1/S	Bomba de expulsión
Vancomicina	<0.5/S	Transportado r ABC, <i>vanR</i> , y <i>vanS</i>	<0.5/S	Transportador ABC, <i>vanR</i> , y <i>vanS</i>	<0.5/S	Transportador ABC, <i>vanR</i> , y <i>vanS</i>	<0.5/S	Transportador ABC, <i>vanR</i> , y <i>vanS</i>
Gentamicina (HL) <sup>a</sup>	SYN-S/S	AAC(6')-lii	SYN-S/S	AAC(6')-li	SYN-S/S	AAC(6')-li	SYN-S/S	AAC(6')-li
Estreptomina (HL) <sup>a</sup>	SYN-S/S	AAC(6')-lii	SYN-S/S	AAC(6')-li	SYN-S/S	AAC(6')-li	SYN-S/S	AAC(6')-li
Levofloxacina	<0.12/S	<i>pmrA</i> o <i>lde</i> bomba de expulsión	0.5/S	<i>pmrA</i> o <i>lde</i> bomba de expulsión	2/S	<i>pmrA</i> o <i>lde</i> bomba de expulsión	2/S	<i>pmrA</i> o <i>lde</i> bomba de expulsión
Eritromicina	<0.25/S	-	>8/R	-	2/R <sup>b</sup>	-	2/R <sup>c</sup>	-
Quinupristina/ Dalfopristina	<0.25/S	-	1/S	-	1/S	-	1/S	-
Linezolid	2/S	-	2/S	-	2/S	-	2/S	-
Teicoplanina	<0.5/S	-	<0.5/S	-	<0.5/S	-	<0.5/S	-
Minociclina	<0.5/S	-	<0.5/S	-	<0.5/S	-	<0.5/S	-
Trimetoprima/ Sulfametoxazol	<10 R <sup>b</sup>	<i>dfrE</i>	<10 R <sup>b</sup>	<i>dfrE</i>	<10 R <sup>b</sup>	<i>dfrE</i>	<10 R <sup>b</sup>	<i>dfrE</i>

\*Guía de interpretación de Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM): CLSI M100-S16 + interpretación fenotípica dada por el sistema Vitek 2. Las cepas se clasificaron fenotípicamente como sensibles (S) o, con resistencia intermedia (I) o completa (R); Para los casos de antibióticos que se administran sinérgicamente con otros y en altas concentraciones, no se calcula un valor de CIM sino que se reporta un resultado SYN-S (sensible).

<sup>a</sup> HL: "high level", se probó la resistencia a altas concentraciones, ya que la evidencia fenotípica previa demuestra niveles basales de resistencia intrínsecos en los enterococos para estos antibióticos.

<sup>b</sup> Se cambiaron los fenotipos S por R, de acuerdo al sistema experto del equipo (AES).

<sup>c</sup> Se cambió el fenotipo I por R, de acuerdo al sistema experto del equipo (AES).

A continuación, las anotaciones realizadas por Rast nos permitieron identificar en todas las cepas genes codificantes de betalactamasas putativas. Además, la cepa IQ110 posee el gen *fosX* que podría otorgarle la resistencia intermedia observada para fosfomicina. También encontramos genes anotados como de tolerancia a vancomicina (transportadores de tipo ABC) en todas las cepas, pero ningún gen *van* pudo ser detectado por este servicio.

Dado que la resistencia a vancomicina es una característica frecuente en enterococos, quisimos profundizar estas predicciones por medio de una búsqueda manual con BLAST. Para ello seleccionamos los genes *van* de la cepa de *E. faecium* DO como referencia. De esta manera encontramos los genes *vanR* y *vanS*, miembros del sistema de dos componentes que activa a los genes de resistencia *van*, pero ninguno de estos últimos pudo ser encontrado en ninguna de las cepas. Como consecuencia, podemos decir que junto con el resultado negativo en el ensayo *in vivo*, que las cepas no poseen resistencia a vancomicina (Tabla 27).

Para el caso de la cepa de *E. durans* IQ23, ResFinder no fue capaz de predecir ninguna resistencia. Aunque, la inspección detallada de las anotaciones de Rast reveló dos bombas putativas de expulsión de múltiples drogas, una de ellas similar a PmrA de *Streptococcus pneumoniae*, otra a Lde de *Listeria monocytogenes* (ambas podrían conferir resistencias a fluoroquinolonas). Una tercera predicción revelada por este programa correspondería a una bomba de tetraciclina. Estas mismas bombas fueron también halladas en las cepas de *E. faecium*, lo cual podría explicar la resistencia intermedia de la cepa GM70 a ciprofloxacina, pero no así la susceptibilidad a este antibiótico del resto, o para levofloxacina o tetraciclina (o minociclina) en todas las cepas (Tabla 27).

Al mismo tiempo nos interesó buscar el gen *pbp5*, descrito previamente en *E. faecium* (Rice et al., 2009; Sifaoui et al., 2001), cuyas mutaciones están asociadas a la resistencia a ampicilina. Dado que nuestro fenotipo es sensible para este antibiótico en las cuatro cepas, quisimos corroborar la concordancia entre los datos fenotípicos y los genotípicos. Ninguna de las cepas mostró la forma *pbp5*-S (encontrada en las cepas sensibles a ampicilina), pero tampoco se encontró la forma *pbp5*-R (presente en las



cepas resistentes). En su lugar, se exhiben formas híbridas, que no pueden asociarse a un fenotipo en particular (Pietta et al., 2014; Tabla 27).

Para completar las predicciones, utilizamos, la base de datos CARD (Jia et al., 2017). La herramienta de búsqueda presente en el sitio web nos permitió identificar genes que otorgarían resistencias a aminoglucósidos (AAC(6')-I<sup>h</sup> y AAC(6')-I<sup>I</sup>) y a trimetoprima (*dhfrE*) en todos los casos (Tabla 27). Esto podría explicar la resistencia a los niveles bajos de gentamicina y estreptomicina (antibióticos del grupo de los aminoglucósidos), motivo por el cual se realiza la prueba con altas concentraciones según el sistema Vitek®2 (Tabla 27). Por otro lado, también explicaría la resistencia intrínseca de los enterococos a trimetoprima junto a sulfametoxazol. No obstante, y a pesar del cambio realizado por el equipo, todas las cepas resultan sensibles a este conjunto.

Para el caso de eritromicina, el sistema Vitek®2 sugiere cambiar todos los resultados para *E. faecium* a resistentes. Previo a ello, las cepas GM75 y GM70, dieron algún tipo de resistencia frente a este antibiótico. A pesar de que no se pudo encontrar ninguna función anotada que pudiera asociarse a esta resistencia, como antibiótico miembro de los macrólidos generarse una resistencia cruzada con las estreptograminas B y lincosamidas. En este sentido el gen *msrC* encontrado podría estar jugando un rol importante.

## Evaluación de la virulencia

Para iniciar la evaluación de la virulencia de las cepas de enterococos aisladas a partir de queso, se realizaron estudios predictivos *in silico*.

Se utilizó la herramienta web PathogenFinder (Cosentino et al., 2013) que calcula un valor para cada cepa y define su “probabilidad de ser patógeno”. Para nuestros aislamientos se obtuvieron valores probabilísticos muy bajos, de modo que según este programa serían cepas no patógenas para los seres humanos.

Luego, utilizamos la herramienta VirulenceFinder (Kleinheinz et al., 2014) que permite la búsqueda de factores de virulencia comunes. Únicamente logramos encontrar en las cepas de *E. faecium* el factor *efaA<sub>fm</sub>*, con valores de identidad arrojados

por el programa por encima del 94%. Para la cepa IQ23, en cambio, no fue posible detectar ningún factor de virulencia.

Para finalizar, realizamos una búsqueda manual, usando BLAST, de factores de virulencia frecuentes en enterococos utilizando secuencias de referencia disponibles en la web. Los resultados se describen en la Tabla 28. Solo tres de los genes buscados fueron identificados satisfactoriamente en las cepas GM70, GM75 e IQ110, mientras que tan solo uno en la IQ23.

**Tabla 28.** Factores de virulencia identificados en las cepas IQ23, GM75, IQ110 y GM70.

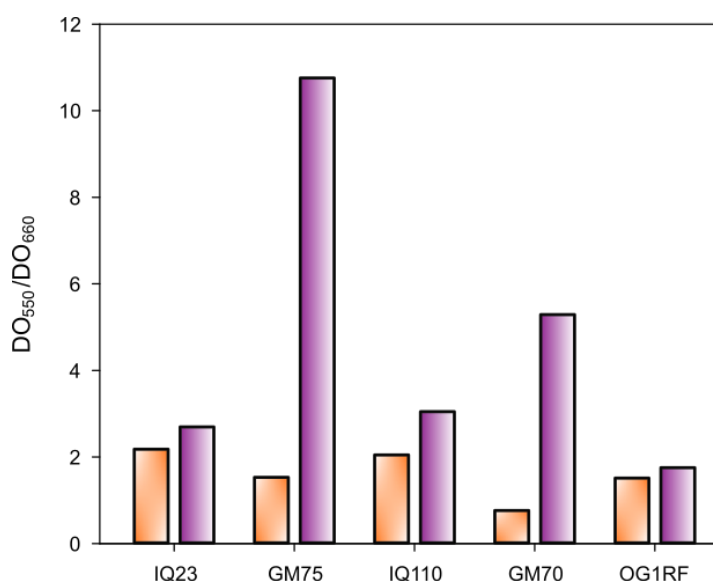
Factor de Virulencia	Rol	Gen(es)	Presencia			
			IQ23	IQ110	GM75	GM70
Sustancia de agregación	Adhesión	<i>asa1</i> <sup>(1)</sup>	No	No	No	No
Citolisina	Lisis celular	<i>cylM, cylL, cylS</i> <sup>(1)</sup>	No	No	No	No
Gelatinasa	Translocación	<i>gelE</i> <sup>(1)</sup>	No	No	No	No
Hialuronidasa	Translocación	<i>hyl</i> <sup>(2)</sup>	No	No	No	No
Proteína de superficie de enterococos	Adhesión	<i>esp</i> <sup>(3)</sup>	No	No	No	No
Proteínas de pili asociadas a biofilm y endocarditis	Formación de biofilm	<i>ebpR, ebpA, ebpB, ebpC</i> <sup>(2)</sup>	Sí	Sí	No	No
“Enhancer” de biofilm en <i>Enterococcus</i>	Formación de biofilm	<i>bee1, bee2, bee3</i> y genes para sortasas <sup>(4)</sup>	No	No	Sí	Sí
Proteína secundaria de adhesión a colágeno	Adhesión	<i>scm</i> <sup>(2)</sup>	No	Sí	No	Sí
Proteína de adhesión a colágeno	Adhesión	<i>acm</i> <sup>(2)</sup>	No	No	Sí	No
Antígeno secretado	Adhesión	<i>sagA</i> <sup>(2)</sup>	No	Sí	Sí	Sí
<b>N° de factores de virulencia predichos total</b>			<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>

Se utilizaron las secuencias de los genes de *E. faecalis* V583 (1), *E. faecium* DO (2), *E. faecium* Aus0004 (3) y *E. faecalis* E99 (4) como modelos para las búsquedas en BLAST.

Teniendo en cuenta que los factores de virulencia detectados estarían involucrados en la adhesión o formación de biofilm, analizamos la capacidad formadora de biofilm de las cepas. Considerando la asociación entre el metabolismo de citrato y la virulencia observada en el capítulo uno para *E. faecalis*, se decidió analizar la capacidad para formar biofilm también en presencia de este metabolito. Crecimos las cepas junto

a un control positivo, la cepa de *E. faecalis* OG1RF (Nallapareddy et al., 2011; Sillanpää et al., 2013), en una microplaca de 96 pocillos por 48 horas a 37°C, para luego medir la absorción del colorante violeta cristal sobre las células adheridas (formando biofilm) en el pocillo. Los medios de cultivo elegidos fueron LB suplementado con glucosa 30mM (LBG) y LB suplementado con citrato 15mM (LBC).

Como se ve en la Fig. 36 todas las cepas son capaces de formar biofilm, en la misma o mayor medida que la cepa OG1RF. Para los crecimientos en medio LBG no se detectaron diferencias significativas entre la capacidad formadora de biofilm presentada por las cepas ( $P > 0,09$ ). Sin embargo, cuando se sustituye la glucosa por citrato, las dos cepas de *E. faecium* Cit<sup>+</sup>, GM70 y GM75, aumentaron significativamente la producción de biofilm ( $P < 0,001$ ), mientras que para las cepas IQ110, IQ23 y la cepa control no se repiten tales resultados. Esto podría asociarse a la presencia de los genes *bee* en las cepas GM75 y GM70, no obstante no explica el motivo por el cual el citrato permitiría una mejor adhesión.

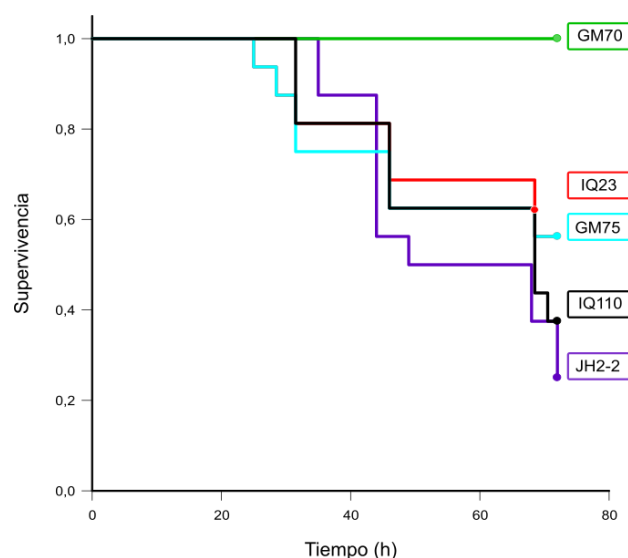


**Fig. 36. Capacidad para formar biofilm.** Se grafican los valores de absorbancia del colorante ( $DO_{550}$ ) sobre los de las  $DO_{660}$  medidas para las cepas. La cepa OGR1F se utilizó como control positivo. Barras anaranjadas: crecimiento en medio LB suplementado con glucosa 30mM; barras violeta: crecimiento en medio LB suplementado con citrato 15mM.

Para profundizar acerca del potencial patogénico de estas cepas, las comparamos en el modelo animal *G. mellonella*. Se analizó la supervivencia de grupos de 16 larvas inoculadas con suspensiones bacterianas de las cepas IQ23, GM75, GM70 e

IQ110 en buffer PBS. Se inyectó un total de  $1 \times 10^7$  UFC/larva. Posteriormente se realizaron las curvas de Kaplan-Meier con los datos recogidos en la (Fig. 37).

La cepa GM70 se diferencia del resto ( $P < 0,05$ ) ya que luego de 72 h no produjo ninguna muerte. Este resultado se asemeja a los resultados observados para la cepa inocua *L. lactis* IL1403 (capítulo uno). Por otro lado, las curvas de supervivencia de las cepas IQ110, IQ23 y GM75 no se diferencian de la *E. faecalis* JH2-2 (Fig. 37).



**Fig. 37. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier.** Se realizaron inoculaciones de  $1 \times 10^7$  UFC/larva con las cepas IQ23, GM75, GM70 e IQ110 y *E. faecalis* JH2-2.

Es importante destacar que la virulencia de los cuatro aislamientos y de la cepa control *E. faecalis* JH2-2 es considerablemente menor que la exhibida por cepas de enterococos provenientes de clínica. Las inoculaciones con la cepa *E. faecalis* V583 producen casi un 100% de mortalidad y la cepa OG1RF un 72% aproximado, luego de 48 horas y cuando se inyectan  $2 \times 10^6$  UFC/larva (Gaspar et al., 2009), un valor mucho más bajo que el utilizado en estos experimentos ( $1 \times 10^7$ ). Luego de 50h la cepa IQ23 produce un 50% de mortalidad, mientras que la IQ110 y GM75 menos de un 30% y la GM70 no provoca muertes, sobreviviendo el 100% de los individuos (Fig. 37). Esto quiere decir que, a pesar de provocar la muerte de parte del grupo a prueba, los efectos de estas inoculaciones no son tan nocivos como los observados con cepas clínicamente peligrosas.

Por otro lado, los resultados sugieren que la presencia o ausencia de los genes *cit* en las cepas de *E. faecium* no influenciaría su virulencia, a diferencia de lo que

sucede con la cepa *E. faecalis* JH2-2, ya que cepas de la misma especie con o sin los genes se comportan de manera similar (cepa IQ110 comparada con la cepa GM75). Sin embargo, la gran diversidad genética que presentan las cepas dificulta tal comparación, siendo, posiblemente, el metabolismo del citrato solo una ruta más involucrada en la supervivencia y adaptación a nicho, entre muchas otras diferenciales.

Por último, determinamos los grupos ST a los cuales pertenecen las cepas de *E. faecium*, GM75, IQ110 y GM70. Tal predicción no puede realizarse para la cepa IQ23 por pertenecer a una especie diferente. Utilizando la herramienta MLST 1.8 (Larsen et al., 2012), asignamos a la cepa GM75 el grupo ST-94, a la cepa GM70 el grupo ST-545 y a la IQ110 el grupo ST-52. Ninguno de estos grupos contiene cepas patógenas o peligrosas para la salud humana.

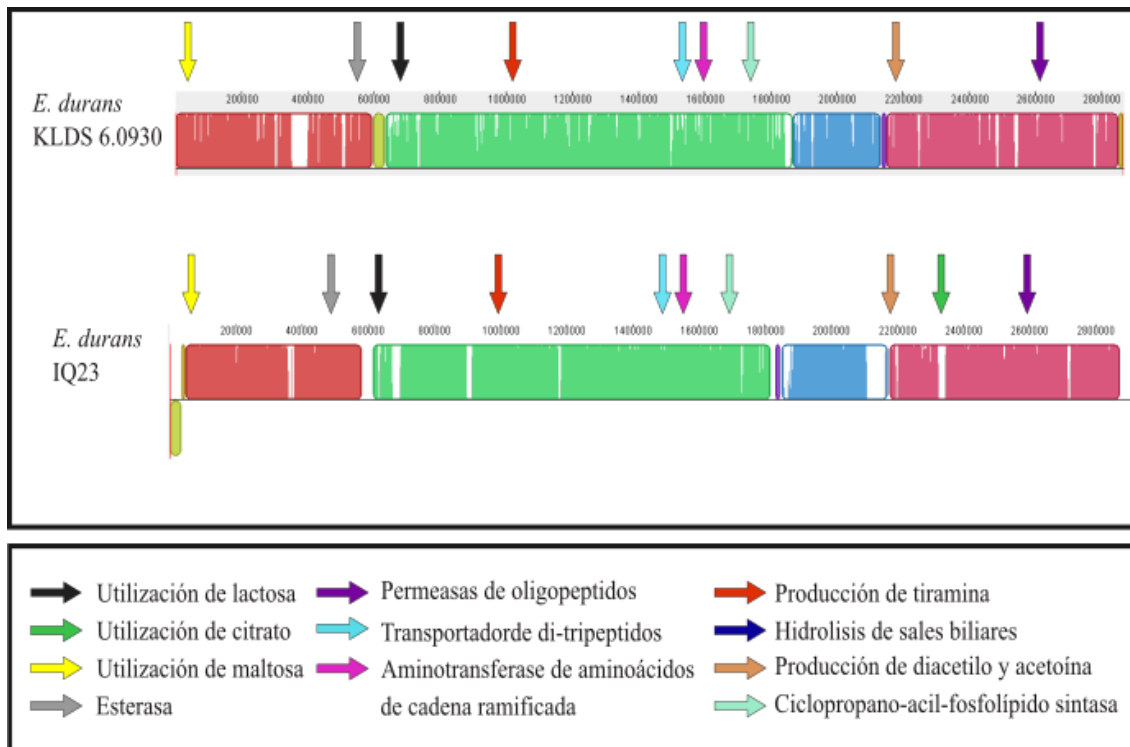
### Sintenia genómica

Por último, nos interesó analizar las posiciones relativas de las principales funciones detectadas en este capítulo, en cada cepa y respecto de una cepa referencia, también aislada de alimentos.

Para ello, utilizando el programa Mauve (Darling et al., 2004), analizamos la sintenia, es decir el grado de conservación de regiones o bloques genómicos, así como de genes en particular, lo cual es indicador de la cercanía de las cepas respecto de un ancestro común (Deniélou et al., 2011; Duran et al., 2009). Los resultados se muestran en la Fig. 38 y 39.

La Fig. 38 muestra la comparación realizada para la cepa IQ23 con la cepa *E. durans* KLDS 6.0930, un aislamiento lácteo de origen chino (Guo et al., 2016). Se localizaron funciones relacionadas a catabolismos relevantes en las cepas que crecen en leche o probióticas: genes de degradación de lactosa, de maltosa, de citrato, de tolerancia e hidrólisis de sales biliares, de descarboxilación de tiramina, de transportadores de péptidos, la esterasa *estA*, el operón *alsSD* y de la aminotransferasa *bcaT*. Como se puede ver en la Fig. 38, las posiciones relativas de todos los genes detectados se conservan para estas dos cepas de diferentes orígenes. A su vez, el bajo número de bloques localizados colinealmente (BLCs; seis) revelados por Mauve (Darling et al., 2004) indican un alto grado de similitud de secuencias entre las cepas

comparadas. Ésto sugiere un elevado grado de conservación de la especie *E. durans* desde sus orígenes evolutivos.



**Fig. 38. Alineamientos genómicos y sintenia para las cepas IQ23 y KLDS 6.0930.** Cada bloque coloreado representa una región genómica conservada. Una posición diferente del mismo tipo de bloque en la cepa IQ23 refleja una reorganización genómica respecto a la referencia. Los bloques debajo de la línea central representan regiones invertidas respecto del genoma de referencia. Los espacios en blanco indican secuencias únicas en cada cepa. Las funciones localizadas se señalan con flechas de colores: negra para el operón *lacABCD*, verde para los genes *citI-citMPCDEFXG*, amarillo para el operón *malEFGA* y el gen *aglB*, gris para el gen *estA*, violeta para el operón *oppDFBCA*, celeste para el gen *dtpT*, blanco para el gen *prtR*, azul para el gen de la enzima *BSH*, rojo para el operón *tyrPDC*, naranja para el operón *alsSD*, rosa para el gen *bcaT* y verde claro para el gen de la ciclopropano-acil-fosfolípido sintasa.

Por otro lado, las comparaciones de las cepas de *E. faecium* aisladas en el laboratorio con la cepa *E. faecium* NRRL-B2354 (Kopit et al., 2014) generaron una mayor cantidad de BLCs (29), lo cual indica una mayor diversidad estructural genómica entre estas cepas (Fig. 39). A pesar de que las posiciones relativas de las funciones identificadas se conservan en términos generales, existen diferencias con la esterasa, la proteinasa de pared celular, el metabolismo de lactosa y de citrato.

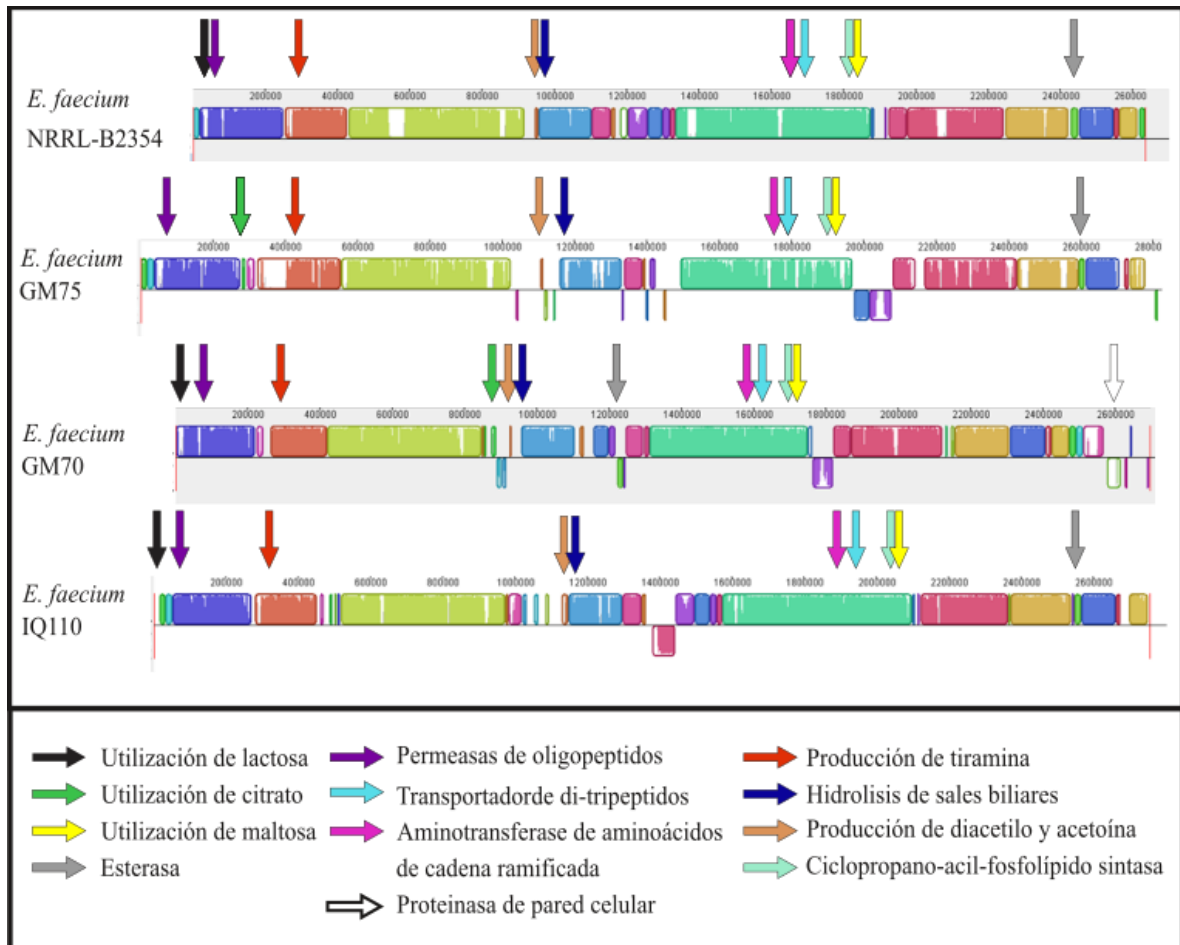


Fig. 389. Alineamientos genómicos y sintenia para las cepas GM75, GM70, IQ110 y NRRL-B2354. Las funciones ubicadas con flechas corresponden a las mismas que se indican en la Fig.38, a excepción de la flecha blanca que señala la posición de la proteinasa de pared celular identificada en la cepa GM70.

## Discusión capítulo III

La selección de bacterias con propiedades útiles y que al mismo tiempo sean seguras para el consumo humano ha sido una actividad crucial desde el origen de los alimentos fermentados. Al día de hoy, la mayoría de las cepas utilizadas fueron seleccionadas por medio de metodologías tradicionales, tales como las mediciones bioquímicas de actividades metabólicas de interés. No obstante, actualmente, las estrategias de selección pueden beneficiarse de la facilidad para obtener secuencias genómicas y de la gran cantidad de datos disponibles en las bases de datos, como Genbank o Refseq, contra los cuales cotejar la información genómica obtenida.

Los enterococos han sido consumidos históricamente por diferentes culturas a lo largo del mundo. No obstante, la creciente detección de cepas en clínica causantes de enfermedades en pacientes comprometidos inmunológicamente, impide que el género *Enterococcus* sea clasificado como seguro para el consumo humano (GRAS- FDA- o QPS- EFSA). La capacidad de los enterococos para mediar la transferencia de diferentes elementos genéticos móviles (incluidos plásmidos, fagos y transposones conjugativos) preocupa especialmente en términos de su consumo (Clewell et al., 1975; Coburn et al., 2007; Davis et al., 2005; Flannagan y Clewell, 1991).

Con la finalidad de caracterizar en profundidad a las cepas de enterococos aisladas a partir de queso y con la perspectiva de una futura aplicación industrial, seleccionamos cuatro cepas representativas IQ23, IQ110, GM70, y GM75. Realizamos una inspección detallada tanto de las características que harían seguro su consumo, así como de las propiedades que propiciarían una potencial aplicación industrial.

Utilizando una combinación de herramientas *in silico* y ensayos *in vivo*, fuimos capaces de obtener una imagen integrada de la diversidad genética que presentan las cepas del grupo *E. faecium*.

Al mismo tiempo, en este capítulo destacamos la importancia de los análisis filogenómicos más sofisticados para la correcta asignación de las especies. Pudimos determinar que la cepa IQ23, inicialmente definida como *E. faecium* a través de la secuenciación de su ARNr 16S, pertenecía a la especie *E. durans*. Estos resultados indican la necesidad de la utilización de metodologías diferentes y complementarias que permitan la correcta identificación de especies, lo cual es una condición *sine qua*



*non* para realizar cualquier análisis bioinformático comparativo posterior (Espariz et al., 2016).

Gracias a las diversas herramientas bioinformáticas disponibles, un perfil metabólico de funciones putativas presentes y ausentes en cada cepa pudo ser establecido. Encontramos elementos positivos comunes como rutas para la fermentación de diversos azúcares, catabolismos relevantes como el de citrato, piruvato o aminoácidos. Detectamos genes necesarios para la supervivencia en presencia de sales biliares. Además, detectamos los genes necesarios para la producción de tiramina, los cuales constituyen un riesgo para el uso de *E. faecium* ya que otorgan la capacidad de producir compuestos tóxicos (aminas biogénicas).

Por otro lado, la identificación exhaustiva de los elementos putativos capaces de ser transferidos y de los genes involucrados en las resistencias antibióticas es crucial, con el fin de minimizar la transferencia de estos marcadores desde y hacia bacterias patogénicas (Wozniak y Waldor, 2010).

Se detectó una diversa variedad de genes relacionados a resistencias antibióticas, la mayoría de las cepas resultaron susceptibles a los antibióticos comúnmente utilizados en clínica.

Luego, la virulencia en el modelo *G. mellonella* se estimó menor que la de cepas patógenas. En particular, la cepa GM70 no presentó virulencia, permitiendo la supervivencia completa del grupo de larvas inoculadas.

Lo analizado en este capítulo nos permitió establecer que los niveles de correlación entre los datos obtenidos *in vivo* e *in silico* son altos, a pesar de que es siempre necesaria la inspección detallada de las predicciones realizadas con los diferentes programas utilizados, así como la corroboración *in vivo* de aquellos datos de mayor relevancia, como las resistencias antibióticas.

Los resultados presentados en este capítulo demuestran las ventajas de utilizar estrategias combinadas con el propósito de conseguir una selección racional de microorganismos destinados a ser utilizados en la producción de alimentos fermentados, especialmente quesos. Las técnicas de análisis de genomas sumadas a pruebas fenotípicas clásicas permiten nuevas formas de abordar la información, y

descubrir la diversidad genotípica que puede o no ser causa de los comportamientos fenotípicos.

De este modo, fuimos capaces de determinar que cada cepa aislada es poseedora de un reservorio génico particular con una distribución específica, solo compartido en parte por otros ejemplares de la especie, lo que las hace únicas y poseedoras de gran potencialidad.

Adicionalmente, las cepas GM70 e IQ23 presentan gran cantidad de propiedades positivas respecto de sus metabolismos principales así como en sus resistencias antibióticas, factores de virulencia y virulencia en *G. mellonella*. Estas características las hacen potenciales candidatos para ser utilizados como cultivos adjuntos en la producción de quesos.

### Conclusiones parciales

- ✓ Se observó que no existen diferencias significativas en el número de funciones anotadas por Rast en las cepas aisladas a partir de queso.
- ✓ Se observaron diferencias en los tamaños genómicos, número de CDS y ARNs anotados para cada una de las cepas.
- ✓ El análisis de genes utilizados como marcadores evolutivos, el MLSA, las comparativas con el programa Gegenees y los cálculos de ANI y HDDis permitieron establecer que la cepa IQ23 pertenece a la especie *E. durans*.
- ✓ Se mostró a través de los datos del número de CDS y ARN, de ANI e HDDis que existiría una mayor distancia filogenética entre la cepa GM75 y el resto de las cepas de *E. faecium* estudiadas, lo cual podría ser un indicio de una posible división en subespecies de *E. faecium*.
- ✓ Se identificaron los genes necesarios para que las cepas lleven a cabo diferentes metabolismos de interés, tales como los de lactosa, maltosa, galactosa, fructosa o ribosa; encontrándose diferencias en el metabolismo de ramnosa y arabinosa.
- ✓ Se demostró que las predicciones realizadas con Rast presentan un alto nivel de concordancia con los datos obtenidos por la prueba API, siempre y cuando se realice una inspección manual detallada de las anotaciones.

- ✓ Se identificaron, también, una proteinasa en la cepa GM70, y peptidasas y enzimas necesarias para la degradación de aminoácidos en todas las cepas. En especial, se detectó la enzima responsable de la formación de metanotiol en las cepas GM70 e IQ23. No se pudo detectar actividad proteasa *in vivo*.
- ✓ Se detectaron los genes codificantes de esterasas y lipasas, los genes del metabolismo de citrato y piruvato. No pudieron detectarse los genes *butAB* en ninguna de las cepas. No se pudo detectar actividad esterasa *in vivo*.
- ✓ Se encontraron genes codificantes de bacteriocinas y que permitirían la supervivencia en presencia de sales biliares, ambas características importantes en cepas probióticas.
- ✓ Se identificó la ruta para la formación de tiramina en todas las cepas, pero solo la IQ23, la IQ110 y la GM70 son capaces de producirla en las condiciones ensayadas.
- ✓ Se detectaron gran variedad de secuencias de inserción, islas genómicas y profagos en todas las cepas. No se detectó la IS16, marcador de cepas patógenas ni islas de patogenicidad.
- ✓ No se detectaron loci CRISPR-Cas, ni secuencias plasmídicas. No obstante, se encontró evidencia de la posible presencia de plásmidos que hayan sido secuenciados juntos al ADN cromosomal.
- ✓ Se estableció que ninguna de las cepas posee resistencias a los antibióticos comúnmente utilizados en clínica. Sin embargo se encontraron resistencias a ciprofloxacina en la cepa GM70, a cloramfenicol y fosfomicina en las cepas IQ23 e IQ110, y a trimetoprima/sulfametoxazol y eritromicina en todas las cepas estudiadas.
- ✓ Se determinó que las cepas Cit<sup>+</sup> de *E. faecium* en presencia de citrato presentan una mayor capacidad para formar biofilm que las cepas Cit<sup>-</sup> o la cepa *E. durans* IQ23.
- ✓ Se comprobó que las cepas aisladas de queso no poseen una virulencia mayor que la cepa *E. faecalis* JH2-2 en el modelo animal *G. mellonella*, a excepción de la cepa GM70 que no provoca mortalidad.

## Conclusiones finales

Los genes *cit* en *E. faecalis* constituyen un grupo que forma parte de los genes núcleo de la especie. En concordancia, están presentes en todas sus cepas independientemente del origen de aislamiento.

La inducción de estos genes se observa durante el proceso de infección en fluidos donde el citrato se encuentra presente y el tiempo se corresponde con los de uso de azúcares preferenciales.

El análisis de diferentes mutantes (Fig. 40) permitió observar la contribución del metabolismo del citrato al desarrollo de la infección y la proliferación de *E. faecalis* en tales fluidos, mientras que el modelo de *G. mellonella* constituye un sistema conveniente para éstos estudios iniciales.

El metabolismo de citrato en *E. faecium*, a diferencia de lo que sucede en *E. faecalis*, no forma parte de los genes núcleo de la especie. La mayoría de los aislamientos son genotípicamente Cit<sup>-</sup>, sin embargo una población reducida posee los genes *cit*. Estas cepas Cit<sup>+</sup> se dividen en dos grupos correspondientes al Tipo I y al Tipo II según los genes *cit* que contienen, no obstante, detectamos la expresión de dichos genes solo para el primer grupo (Fig. 41).

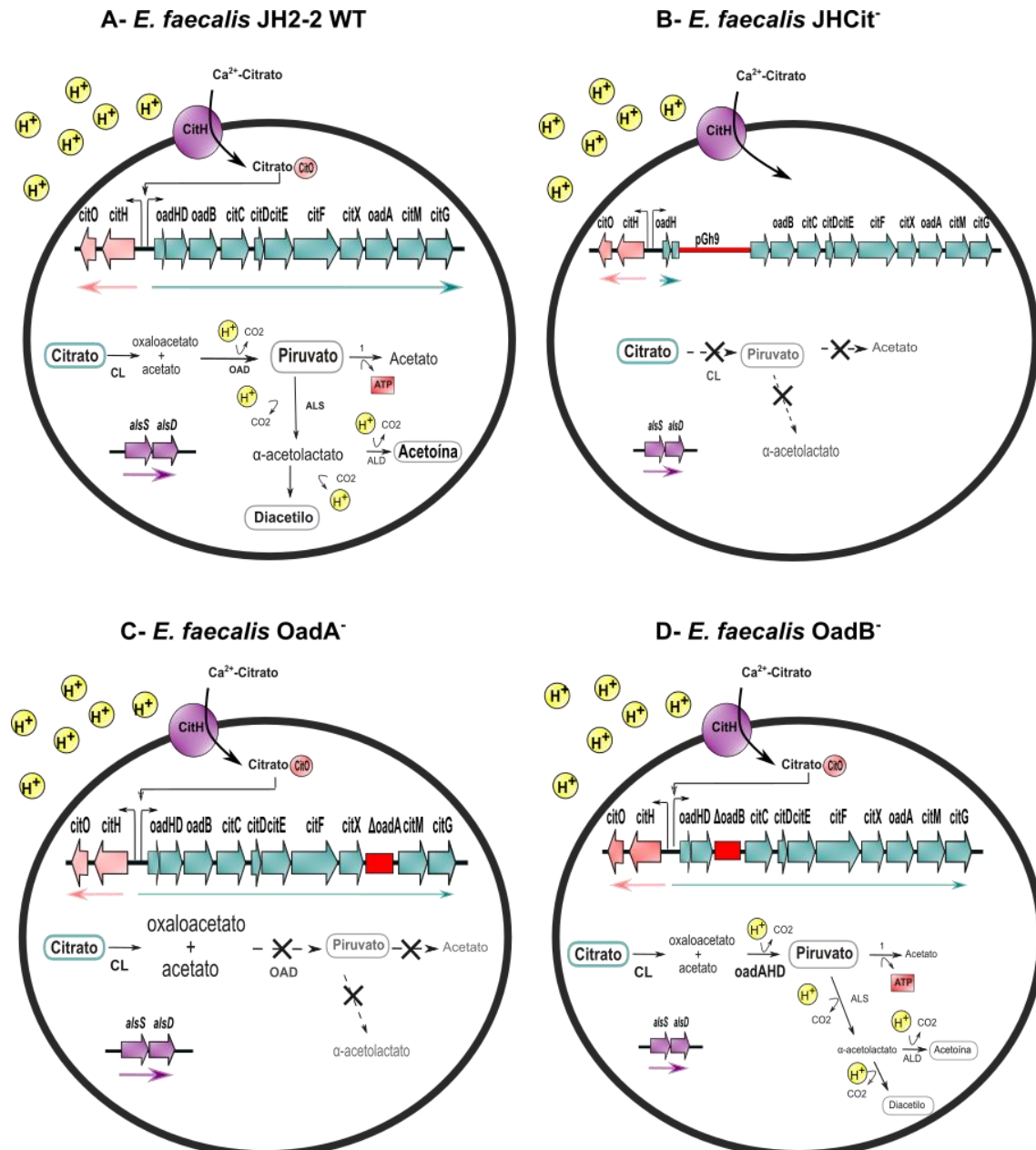
La inducción y represión del sistema en las cepas de Tipo I de *E. faecium* estarían sujetas a los mismos mecanismos regulatorios que los observados en otras BAL, por medio del regulador CitI y las proteínas Hpr-CcpA.

Al mismo tiempo, se determinó una relación directa entre el metabolismo de generación de acetoína y diacetilo y el metabolismo de citrato en estas cepas.

Los resultados obtenidos en este capítulo presentan una metodología ordenada y racional para la identificación, clasificación y caracterización general (tanto en los aspectos positivos como negativos) de aislamientos de enterococos. La misma podría utilizarse en un estudio inicial de cepas destinadas a usarse como cultivos adjuntos en la industria de la producción de quesos.

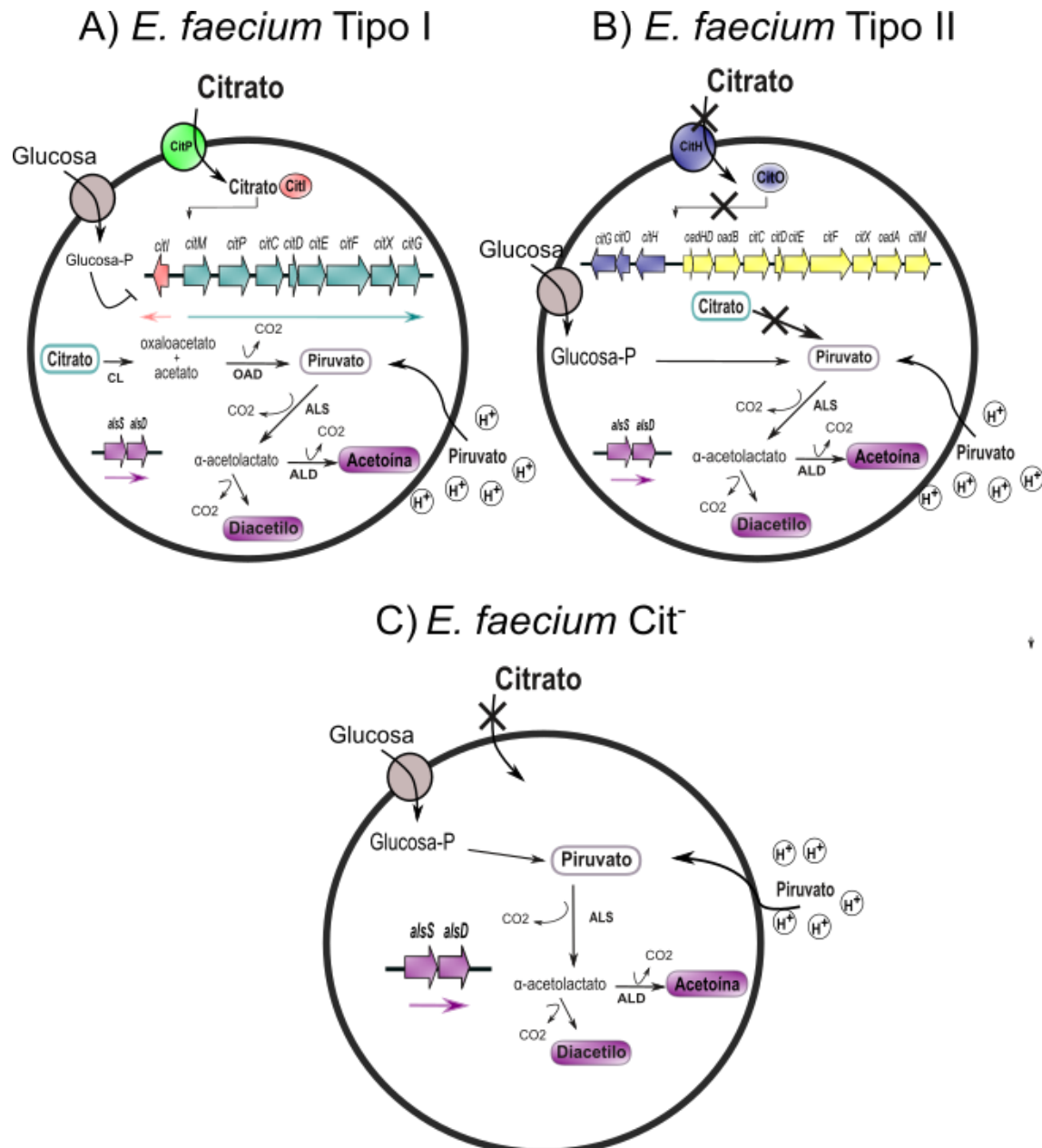
Los análisis propuestos abarcan la inspección de las rutas metabólicas principales desde el punto de vista bioinformático así como a través de ensayos sencillos de rutina, evaluando también propiedades relacionadas a la seguridad en el consumo de las cepas.

La estrategia utilizada (Fig. 42) permitiría una preselección de cepas, las cuales, posteriormente, podrían ser estudiadas en mayor detalle desde el punto de vista tecnológico.



**Fig. 39. Modelos de la expresión génica en las cepa *E. faecalis* JH2-2 y las mutantes JHCit<sup>-</sup>, OadA<sup>-</sup> y OadB<sup>-</sup>.** Se muestran los genes necesarios para la expresión del transportador de citrato (*citH*), del regulador transcripcional (*citO*) y de las enzimas citrato liasa y oxaloacetato descarboxilasa (*oadHDBcitCDEFXoadAcitMG*), a su vez se representan las vías metabólicas activas y sus efectos en el consumo de protones y generación de ATP. A) Cepa *E. faecalis* JH2-2 (WT): se muestra el consumo de protones como consecuencia de la metabolización de citrato activa y la generación de energía a partir del mismo cuando se produce acetato. B) Cepa JHCit<sup>-</sup>: Se muestra la inserción realizada con el plásmido pGh9 sobre el gen *oadD* y la incapacidad para metabolizar citrato y consumir protones de la cepa. C)

Cepa OadA<sup>-</sup>: Se muestra la delección del gen *oadA* como una caja roja en la posición del gen. Se indica la incorporación a la célula y la conversión de citrato hasta oxaloacetato y acetato y la incapacidad de la cepa para continuar la degradación de estos subproductos. D) Cepa OadB<sup>-</sup>: Se muestra la delección del gen *oadB* como una caja roja en la posición del gen. Se indica la internalización y la degradación completa de citrato que esta cepa puede llevar a cabo a menor velocidad que la WT. CL: citrato liasa; OAD: oxaloacetato descarboxilasa; *oadAHD*: subunidades activas citosólicas de la OAD; ALS:  $\alpha$ -acetolactato sintasa; ALD:  $\alpha$ -acetolactato descarboxilasa.



**Fig. 40. Genes y vías metabólicas activas en cada tipo de cepa de *E. faecium* encontrada.** A) Cepa de Tipo I: se muestran los genes para el regulador (*citI*) y los necesarios para la expresión de la enzima citrato liasa, del transportador y de la oxaloacetato descarboxilasa (*citMPCDEFXG*), el transporte de citrato por medio del transportador CitP, la represión mediada por glucosa como azúcar PTS, la incorporación de piruvato desde el exterior en medio ácido y la generación de compuestos de aroma (diacetilo y acetoina) a partir de éste último y de citrato. B) Cepa de Tipo II: se muestran los genes para el regulador, el transportador (*citO* y *citH*) y los necesarios para la expresión de la enzima citrato liasa, del transportador y de la oxaloacetato descarboxilasa (*citG-oadHDB-citDEFX-aodA-citM*), la incapacidad para incorporar y metabolizar citrato

evidenciada y la capacidad para generar aroma a partir de piruvato de otras fuentes. C) Cepa cit-: se muestra la incapacidad para incorporar y metabolizar citrato evidenciada y la capacidad para generar aroma a partir de piruvato de otras fuentes. CL: citato liasa; OAD: oxaloacetato descarboxilasa, ALS:  $\alpha$ -acetolactato sintasa; ALD:  $\alpha$ -acetolactato decarboxilasa.

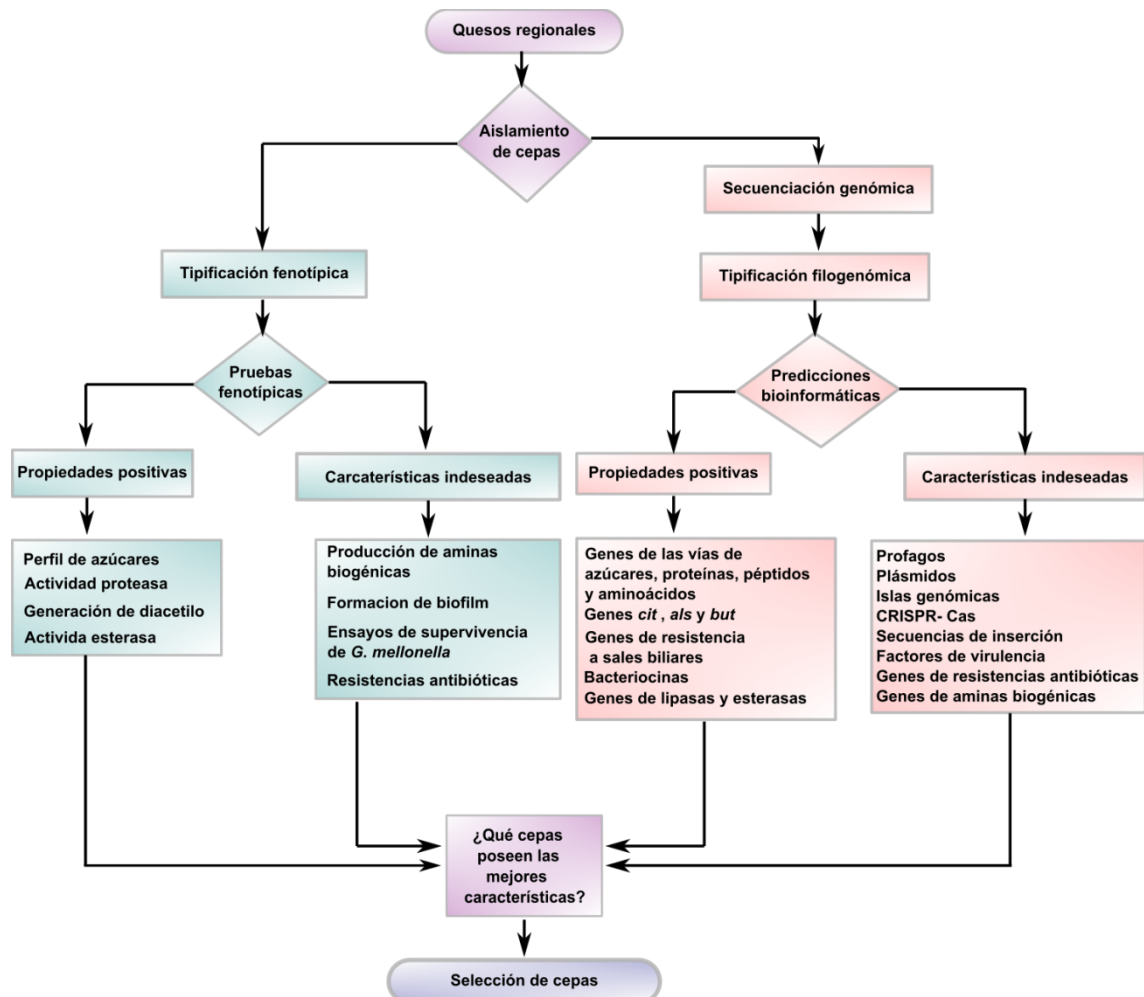


Fig. 41. Esquema general del análisis realizado sobre las cepas aisladas de quesos.



## Referencias

- Ågren, J., Sundström, A., Håfström, T., and Segerman, B. (2012). Gegenees: Fragmented Alignment of Multiple Genomes for Determining Phylogenomic Distances and Genetic Signatures Unique for Specified Target Groups. *PLoS One* 7, e39107.
- Agudelo Higueta, N.I., and Huycke, M.M. (2014). Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In *Enterococci. From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection.*, E. Michael S Gilmore Don B Clewell, Yasuyoshi Ike, and Nathan Shankar., ed. (Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary;).
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Araújo, T.F., and Ferreira, C.L. de L.F. (2013). The genus *Enterococcus* as probiotic: Safety concerns. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56, 457–466.
- Arias, C.A., and Murray, B.E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 266–278.
- Arndt, D., Grant, J.R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., and Wishart, D.S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST page search tool. *Nucleic Acids Res* 44, W16–21.
- Aungpraphapornchai, P., Griffin, H., and Gasson, M. (1999). Cloning, DNA sequence analysis, and deletion of a gene encoding diacetyl-acetoin reductase from *Lactococcus lactis*. *DNA Seq. J. DNA Seq. Mapp.* 10, 163–172.
- Bargossi, E., Gardini, F., Gatto, V., Montanari, C., Torriani, S., and Tabanelli, G. (2015). The Capability of Tyramine Production and Correlation between Phenotypic and Genetic Characteristics of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains. *Front. Microbiol.* 6, 1371.
- Barry, A.L., and Feeney, K.L. (1967). Two Quick Methods for Voges-Proskauer Test. *Appl. Microbiol.* 15, 1138–1141.
- Bekal, S., Van Beeumen, J., Samyn, B., Garmyn, D., Henini, S., Diviès, C., and Prévost, H. (1998). Purification of *Leuconostoc mesenteroides* Citrate Lyase and Cloning and Characterization of the *citCDEFG* Gene Cluster. *J. Bacteriol.* 180, 647–654.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., and Sayers, E.W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Res* 41, D36–42.
- Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G.L., Cavadini, C., Sauthier, T., Anderson, R.E., Schiffrin, E.J., and von der Weid, T. (2003). Supplementation of Food with *Enterococcus faecium* (SF68) Stimulates Immune Functions in Young Dogs. *J. Nutr.* 133, 1158–1162.
- Blancato, V.S., Magni, C., and Lolkema, J.S. (2006). Functional characterization and  $\text{Me}_2^+$  ion specificity of a  $\text{Ca}^{2+}$ -citrate transporter from *Enterococcus faecalis*. *FEBS J.* 273, 5121–5130.
- Blancato, V.S., Repizo, G.D., Suárez, C.A., and Magni, C. (2008). Transcriptional regulation of the citrate gene cluster of *Enterococcus faecalis* involves the GntR family transcriptional activator CitO. *J. Bacteriol.* 190, 7419–7430.

- Blancato, V.S., Pagliai, F.A., Magni, C., Gonzalez, C.F., and Lorca, G.L. (2016). Functional Analysis of the Citrate Activator CitO from *Enterococcus faecalis* Implicates a Divalent Metal in Ligand Binding. *Front. Microbiol.* 7, 101.
- Bott, M. (1997). Anaerobic citrate metabolism and its regulation in enterobacteria. *Arch. Microbiol.* 167, 78–88.
- Bott, M., Meyer, M., and Dimroth, P. (1995). Regulation of anaerobic citrate metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 18, 533–546.
- Bover-Cid, S., and Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 53, 33–41.
- Broadbent, J.R., Barnes, M., Brennand, C., Strickland, M., Houck, K., Johnson, M.E., and Steele, J.L. (2002). Contribution of *Lactococcus lactis* Cell Envelope Proteinase Specificity to Peptide Accumulation and Bitterness in Reduced-Fat Cheddar Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1778–1785.
- Browne, N., Heelan, M., and Kavanagh, K. (2013). An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* 4, 597–603.
- Cabral, M.E., Mukdsi, M.C.A., Medina de Figueroa, R.B., and González, S.N. (2007). Citrate metabolism by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from goat's and ewe's milk: influence of glucose and lactose. *Can. J. Microbiol.* 53, 607–615.
- Caplice, E., and Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 131–149.
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., and Hasman, H. (2014). In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 3895–3903.
- Cariolato, D., Andrighetto, C., and Lombardi, A. (2008). Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control* 19, 886–892.
- Carver, T., Thomson, N., Bleasby, A., Berriman, M., and Parkhill, J. (2009). DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics* 25, 119–120.
- Carver, T.J., Rutherford, K.M., Berriman, M., Rajandream, M.-A., Barrell, B.G., and Parkhill, J. (2005). ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 21, 3422–3423.
- Casadevall, A. (2005). Host as the variable: Model hosts approach the immunological asymptote. *Infect. Immun.* 73, 3829–3832.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17, 540–552.
- Choi, S.-B., Lew, L.-C., Yeo, S.-K., Nair Parvathy, S., and Liong, M.-T. (2015). Probiotics and the BSH-related cholesterol lowering mechanism: a Jekyll and Hyde scenario. *Crit. Rev. Biotechnol.* 35, 392–401.

- Chopin, A., Chopin, M.C., Moillo-Batt, A., and Langella, P. (1984). Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid* 11, 260–263.
- Cocolin, L., Dolci, P., and Rantsiou, K. (2011). Biodiversity and dynamics of meat fermentations: The contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. 57th Int. Congr. Meat Sci. Technol. 57th ICoMST 7-12 August 2011 Ghent Belg. 89, 296–302.
- Coenye, T., and Vandamme, P. (2003). Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects: the lactic acid bacteria as a test case. *Microbiology* 149, 3507–3517.
- Coeuret, V., Gueguen, M., and Vernoux, J.P. (2004). Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 147–156.
- Cogan T.M., H.C. (1993). Cheese Starter Cultures. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.*, (Boston, MA: Springer.), p.
- Cook, S.M., and McArthur, J.D. (2013). Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence* 4, 350–3.
- Cosentino, S., Voldby Larsen, M., Moller Aarestrup, F., and Lund, O. (2013). PathogenFinder—distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data. *PLoS One* 8, e77302.
- DACREMONT, C., and VICKERS, Z. (1994). Concept Matching Technique for Assessing importance of Volatile Compounds for Cheddar Cheese Aroma. *J. Food Sci.* 59, 981–985.
- Darling, A.C.E., Mau, B., Blattner, F.R., and Perna, N.T. (2004). Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. *Genome Res.* 14, 1394–1403.
- David F. Putnam (1971). Composition and concentrative properties of human urine. *Natl. Aeronaut. SPACE Adm.*
- De Graef, E.M., Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Collins, M.D., Lefebvre, K., Swings, J., and Haesebrouck, F. (2003). Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al. 2001. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1069–1074.
- De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van De Ven, S., and Degeest, B. (1998). Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.* 84, 1059–1068.
- De Vuyst, L., Vaniengelgem, F., Ghijsels, V., Tsakalidou, E., and Leroy, F. (2011). New insights into the citrate metabolism of *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 and its possible impact on the production of fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 21, 580–585.
- Deniélou, Y.-P., Sagot, M.-F., Boyer, F., and Viari, A. (2011). Bacterial synteny: an exact approach with gene quorum. *BMC Bioinformatics* 12, 193–193.
- Deutscher, J., Herro, R., Bourand, A., Mijakovic, I., and Poncet, S. (2005). P-Ser-HPr - A link between carbon metabolism and the virulence of some pathogenic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1754, 118–125.

- Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P.W. (2006). How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 939–1031.
- Devriese, L.A., Pot, B., and Collins, M.D. (1993). Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 399–408.
- Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Descheemaeker, P., Baele, M., Van Landuyt, H.W., Gordts, B., Butaye, P., Swings, J., and Haesebrouck, F. (2002). Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *J. Appl. Microbiol.* 92, 821–827.
- Dhillon, B.K., Laird, M.R., Shay, J.A., Winsor, G.L., Lo, R., Nizam, F., Pereira, S.K., Waglechner, N., McArthur, A.G., Langille, M.G., et al. (2015). IslandViewer 3: more flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis. *Nucleic Acids Res* 43, W104–8.
- Di Rosa, R., Creti, R., Venditti, M., D’Amelio, R., Arciola, C.R., Montanaro, L., and Baldassarri, L. (2006). Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 256, 145–150.
- Díaz-Muñiz, I., Banavara, D.S., Budinich, M.F., Rankin, S.A., Dudley, E.G., and Steele, J.L. (2006). *Lactobacillus casei* metabolic potential to utilize citrate as an energy source in ripening cheese: A bioinformatics approach. *J. Appl. Microbiol.* 101, 872–882.
- Didari, T., Solki, S., Mozaffari, S., Nikfar, S., and Abdollahi, M. (2014). A systematic review of the safety of probiotics. *Expert Opin. Drug Saf.* 13, 227–239.
- Dimroth, P., and Thomer, A. (1993). On the mechanism of sodium ion translocation by oxaloacetate decarboxylase of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemistry (Mosc.)* 32, 1734–1739.
- Dimroth, P., Jockel, P., and Schmid, M. (2001). Coupling mechanism of the oxaloacetate decarboxylase Na<sup>+</sup> pump. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1505, 1–14.
- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Env. Microbiol* 78, 1–6.
- Dornan, S., and Collins, M.A. (1990). High efficiency electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LM0230 with plasmid pGB301. *Lett. Appl. Microbiol.* 11, 62–64.
- Douillard, F.P., and de Vos, W.M. (2014). Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microb. Cell Factories* 13, S8–S8.
- Dubnau, E., and Smith, I. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* gene expression in macrophages. *Microbes Infect.* 5, 629–637.
- Dubovskiy, I.M., Whitten, M.M.A., Kryukov, V.Y., Yaroslavlseva, O.N., Grizanov, E.V., Greig, C., Mukherjee, K., Vilcinskas, A., Mitkovets, P.V., Glupov, V.V., et al. (2013). More than a colour change: insect melanism, disease resistance and fecundity. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280, 20130584.
- Duran, C., Edwards, D., and Batley, J. (2009). Genetic maps and the use of synteny. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 513, 41–55.

- Dworkin, M., and Falkow, S. (2006). Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt, eds. (Minneapolis: Springer.), p.
- EFSA, E.F.S.A. (2012). Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA J.* **10**, 2682.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (2012). Scientific Opinion on Lactiferm® (*Enterococcus faecium*) as a feed additive for weaned piglets and calves. *EFSA J.* **10**, 2574–n/a.
- Engels, W.J.M., Alting, A.C., Arntz, M.M.T.G., Gruppen, H., Voragen, A.G.J., Smit, G., and Visser, S. (2000). Partial purification and characterization of two aminotransferases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 involved in the catabolism of methionine and branched-chain amino acids. *Int. Dairy J.* **10**, 443–452.
- Ermolaeva, M.A., and Schumacher, B. (2014). Insights from the worm: The *C. elegans* model for innate immunity. *Semin. Immunol.* **26**, 303–309.
- Espariz, M., Zuljan, F.A., Esteban, L., and Magni, C. (2016a). Taxonomic Identity Resolution of Highly Phylogenetically Related Strains and Selection of Phylogenetic Markers by Using Genome-Scale Methods: The *Bacillus pumilus* Group Case. *PLoS One* **11**, e0163098.
- Espariz, M., Zuljan, F.A., Esteban, L., and Magni, C. (2016b). Taxonomic Identity Resolution of Highly Phylogenetically Related Strains and Selection of Phylogenetic Markers by Using Genome-Scale Methods: The *Bacillus pumilus* Group Case. *PLoS One* **11**, e0163098.
- Fallico, V., McSweeney, P.L.H., Horne, J., Pediliggieri, C., Hannon, J.A., Carpino, S., and Licitra, G. (2005). Evaluation of bitterness in Ragusano cheese. *J. Dairy Sci.* **88**, 1288–1300.
- Fedhila, S., Daou, N., Lereclus, D., and Nielsen-LeRoux, C. (2006). Identification of *Bacillus cereus* internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects. *Mol. Microbiol.* **62**, 339–355.
- de Felipe, F.L., Magni, C., de Mendoza, D., and López, P. (1995). Citrate utilization gene cluster of the *Lactococcus lactis* biovar diacetylactis: organization and regulation of expression. *Mol. Gen. Genet.* **MGG 246**, 590–599.
- de Felipe, F.L., López, P., Magni, C., and de Mendoza, D. (1996). Transcriptional activation of the citrate permease P gene of *Lactococcus lactis* biovardiacetylactis by an insertion sequence-like element present in plasmid pCIT264. *Mol. Gen. Genet.* **MGG 250**, 428–436.
- de Figueroa, R.M., Benito de Cardenas, I.L., Sesma, F., Alvarez, F., de Ruiz Holgado, A.P., and Oliver, G. (1996). Inducible transport of citrate in *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *J. Appl. Bacteriol.* **81**, 348–354.
- Flores-Mireles, A.L., Walker, J.N., Caparon, M., and Hultgren, S.J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 269–284.
- Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., and De Vuyst, L. (2006a). The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106**, 1–24.

- Frädrich, C., March, A., Fiege, K., Hartmann, A., Jahn, D., and Härtig, E. (2012). The transcription factor alsr binds and regulates the promoter of the alsSD operon responsible for acetoin formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *194*, 1100–1112.
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., and Stiles, M.E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* *47*, 1–24.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., and Holzapfel, W.H. (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Enterococci Foods Funct. Saf. Asp.* *88*, 105–122.
- Franz, C.M.A.P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., and Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* *151*, 125–140.
- Freitas, A.R., Tedim, A.P., Novais, C., Ruiz-Garbajosa, P., Werner, G., Laverde-Gomez, J.A., Cantón, R., Peixe, L., Baquero, F., and Coque, T.M. (2010). Global Spread of the hyl(Efm) Colonization-Virulence Gene in Megaplasms of the *Enterococcus faecium* CC17 Polyclonal Subcluster. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 2660–2665.
- Galloway-Peña, J., Roh, J.H., Latorre, M., Qin, X., and Murray, B.E. (2012). Genomic and SNP Analyses Demonstrate a Distant Separation of the Hospital and Community-Associated Clades of *Enterococcus faecium*. *PLoS ONE* *7*, e30187.
- García-Cayuela, T., De Cadiñanos, L.P.G., Mohedano, M.L., De Palencia, P.F., Boden, D., Wells, J., Peláez, C., López, P., and Requena, T. (2012). Fluorescent protein vectors for promoter analysis in lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *96*, 171–181.
- García-Quintáns, N., Magni, C., de Mendoza, D., and López, P. (1998). The Citrate Transport System of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* Is Induced by Acid Stress. *Appl. Environ. Microbiol.* *64*, 850–857.
- García-Quintáns, N., Repizo, G., Martín, M., Magni, C., and López, P. (2008). Activation of the diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* CRL264 by acidic growth. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 1988–1996.
- Garnsworthy, P.C., Masson, L.L., Lock, A.L., and Mottram, T.T. (2006). Variation of Milk Citrate with Stage of Lactation and De Novo Fatty Acid Synthesis in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* *89*, 1604–1612.
- Gaspar, F., Teixeira, N., Rigottier-Gois, L., Marujo, P., Nielsen-LeRoux, C., Crespo, M.T.B., Lopes, M. de F.S., and Serror, P. (2009). Virulence of *Enterococcus faecalis* dairy strains in an insect model: the role of *fsrB* and *gelE*. *Microbiology* *155*, 3564–3571.
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* *26*, 163–171.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol* *88*, 215–222.
- Glaeser, S.P., and Kämpfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Taxon. Age Genomics* *38*, 237–245.
- Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., and Tiedje, J.M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* *57*, 81–91.

- Grissa, I., Vergnaud, G., and Pourcel, C. (2007). CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 35, W52–7.
- Guo, L., Li, T., Tang, Y., Yang, L., and Huo, G. (2016). Probiotic properties of *Enterococcus* strains isolated from traditional naturally fermented cream in China. *Microb. Biotechnol.* 9, 737–745.
- Hällgren, A., Claesson, C., Saeedi, B., Monstein, H.-J., Hanberger, H., and Nilsson, L.E. (2009). Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int. J. Med. Microbiol.* 299, 323–332.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.
- Hidron, A.I., Edwards, J.R., Patel, J., Horan, T.C., Sievert, D.M., Pollock, D.A., and Fridkin, S.K. (2008). NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29, 996–1011.
- Holland, R., Liu, S.Q., Crow, V.L., Delabre, M.L., Lubbers, M., Bennett, M., and Norris, G. (2005). Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *Int. Dairy J.* 15, 711–718.
- Holzapel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., and Huis in't Veld, J.H.. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 85–101.
- Homan, W.L., Tribe, D., Poznanski, S., Li, M., Hogg, G., Spalburg, E., van Embden, J.D.A., and Willems, R.J.L. (2002). Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1963–1971.
- Hugenholtz, J., Perdon, L., and Abee, T. (1993). Growth and Energy Generation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* during Citrate Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4216–4222.
- Huson, D.H., and Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 23, 254–267.
- Inoue, M., and Li, X. (2015). Highly active and stable oxaloacetate decarboxylase Na<sup>+</sup> pump complex for structural analysis. *Protein Expr. Purif.* 115, 34–38.
- Jacob, A.E., and Hobbs, S.J. (1974). Conjugal Transfer of Plasmid-Borne Multiple Antibiotic Resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J. Bacteriol.* 117, 360–372.
- Jander, G., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M. (2000). Positive Correlation between Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants in Mice and Insects. *J Bacteriol* 182, 3843–3845.
- Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K., Lago, B.A., Dave, B.M., Pereira, S., Sharma, A.N., et al. (2017). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 45, D566–D573.



- Joint FAO/WHO Expert Consultation (2006). Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.
- Joint FAO/WHO Working Group (2002). Guidelines for the Evaluation of probiotics in Food.
- Jones, M.L., Tomaro-Duchesneau, C., Martoni, C.J., and Prakash, S. (2013). Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence, and future direction for heart health applications. *Expert Opin. Biol. Ther.* 13, 631–642.
- Joyet, P., Mokhtari, A., Riboulet-Bisson, E., Blancato, V.S., Espariz, M., Magni, C., Hartke, A., Deutscher, J., and Sauvageot, N. (2017). Enzymes Required for Maltodextrin Catabolism in *Enterococcus faecalis* Exhibit Novel Activities. *Appl Env. Microbiol* 83.
- Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., and Arul, V. (2013). Probiotics and Its Functionally Valuable Products—A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 641–658.
- Kaplan, E.L., and Meier, P. (1958). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 53, 457–481.
- Karametsi, K., Kokkinidou, S., Ronningen, I., and Peterson, D.G. (2014). Identification of bitter peptides in aged cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* 62, 8034–8041.
- Kavanagh, K., and Reeves, E.P. (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 101–112.
- Kayaoglu, G., and Ørstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 15, 308–320.
- Kinsinger, R.F., Kearns, D.B., Hale, M., and Fall, R. (2005). Genetic Requirements for Potassium Ion-Dependent Colony Spreading in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 187, 8462–8469.
- Kleinheinz, K.A., Joensen, K.G., and Larsen, M.V. (2014). Applying the ResFinder and VirulenceFinder web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and *E. coli* virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. *Bacteriophage* 4, e27943.
- Konings, W.N., Lolkema, J.S., Bolhuis, H., van Veen, H.W., Poolman, B., and Driessen, A.J.M. (1997). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria, Energy transduction and multidrug resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71, 117–128.
- Konstantinidis, K.T., and Tiedje, J.M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U A* 102, 2567–2572.
- Kopit, L.M., Kim, E.B., Siezen, R.J., Harris, L.J., and Marco, M.L. (2014). Safety of the Surrogate Microorganism *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 for Use in Thermal Process Validation. *Appl Env. Microbiol* 80, 1899–1909.
- Kouker, G., and Jaeger, K.E. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 211–213.



- Kristich, C., Rice, L., and Arias, C. (2014). Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. In *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet], (Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary), p.
- Krom, B.P., Warner, J.B., Konings, W.N., and Lolkema, J.S. (2003). Transporters involved in uptake of di- and tricarboxylates in *Bacillus subtilis*. *84*, 69–80.
- Kropp, K.A., Lucid, A., Carroll, J., Belgrudov, V., Walsh, P., Kelly, B., Smith, C., Dickinson, P., O'Driscoll, A., Templeton, K., et al. (2014). Draft Genome Sequence of an *Enterococcus faecalis* Strain Isolated from a Neonatal Blood Sepsis Patient. *Genome Announc.* *2*, e00907-14.
- Krzyściak, W., Pluskwa, K.K., Jurczak, A., and Kościelniak, D. (2013). The pathogenicity of the *Streptococcus* genus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *32*, 1361–1376.
- Kubíčková, J., and Grosch, W. (1997). Evaluation of potent odorants of Camembert cheese by dilution and concentration techniques. *Int. Dairy J.* *7*, 65–70.
- Lackie, A.M. (1988). Immune mechanisms in insects. *Parasitol. Today* *4*, 98–105.
- Ladero, V., Fernández, M., Calles-Enríquez, M., Sánchez-Llana, E., Cañedo, E., Martín, M.C., and Alvarez, M.A. (2012). Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food Microbiol.* *30*, 132–138.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Larsen, M.V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R.L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D.W., Aarestrup, F.M., et al. (2012). Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* *50*, 1355–1361.
- Lauková, A., Kandričáková, A., and Ščerbová, J. (2015). Use of bacteriocin-producing, probiotic strain *Enterococcus faecium* AL41 to control intestinal microbiota in farm ostriches. *Lett. Appl. Microbiol.* *60*, 531–535.
- Leavis, H., Top, J., Shankar, N., Borgen, K., Bonten, M., van Embden, J., and Willems, R.J.L. (2004). A Novel Putative Enterococcal Pathogenicity Island Linked to the *esp* Virulence Gene of *Enterococcus faecium* and Associated with Epidemicity. *J. Bacteriol.* *186*, 672–682.
- Lebreton, F., Schaik, W.V., and Manson, A. (2013). Emergence of Epidemic Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium*. *Am. Soc. Microbiol.* *4*, 1–10.
- Lebreton, F., Willems, R.J.L., and Gilmore, M.S. (2014). *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, M.S. Gilmore, D.B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar, eds. (Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary).
- Lee, G. (2013). Ciprofloxacin Resistance in *Enterococcus faecalis* Strains Isolated From Male Patients With Complicated Urinary Tract Infection. *Korean J. Urol.* *54*, 388–393.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973–983.

- Leroy, F., and De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 67–78.
- Lolkema, J.S., Poolman, B., and Konings, W.N. (1995). Role of scalar protons in metabolic energy generation in lactic acid bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 467–473.
- Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**, 9–13.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- LUDWIG, W., SEEWALDT, E., KILPPER-BÄLZ, R., HEINZ, K., MAGRUM, L., WOESE, C.R., FOX, G.E., and STACKEBRANDT, E. (1985). The Phylogenetic Position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Microbiology* **131**, 543–551.
- Lütgens, M., and Gottschalk, G. (1980). Why a Co-substrate is Required for Anaerobic Growth of *Escherichia coli* on Citrate. *Microbiology* **119**, 63–70.
- Lynch, C.M., McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cogan, T.M., and Drinan, F.D. (1996). Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *Int. Dairy J.* **6**, 851–867.
- Lyon, B.R., Gillespie, M.T., and Skurray, R. a (1987). Detection and characterization of IS256, an insertion sequence in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 3031–8.
- MacCallum, W.G., and Hastings, T.W. (1899). A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (nov. Spec.), with a description of the microorganism. *J. Exp. Med.* **4**, 521–534.
- Magni, C., De Mendoza, D., Konings, W.N., and Lolkema, J.S. (1999). Mechanism of citrate metabolism in *Lactococcus lactis*: Resistance against lactate toxicity at low pH. *J. Bacteriol.* **181**, 1451–1457.
- Maguin, E., Prévost, H., Ehrlich, S.D., Gruss, A., and Ge, L.D. (1996). Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria . These include : Efficient Insertional Mutagenesis in Lactococci and Other Gram-Positive Bacteria. *Microbiology* **178**, 931–935.
- Maiden, M.C.J., Jansen van Rensburg, M.J., Bray, J.E., Earle, S.G., Ford, S.A., Jolley, K.A., and McCarthy, N.D. (2013). MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 728–736.
- Makarova, K.S., and Koonin, E.V. (2007). Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria. *J. Bacteriol.* **189**, 1199–1208.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., et al. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15611–15616.
- Martín, B., Corominas, L., Garriga, M., and Aymerich, T. (2009). Identification and tracing of *Enterococcus* spp. by RAPD-PCR in traditional fermented sausages and meat environment. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 66–77.

- Martín, M., Magni, C., López, P., and de Mendoza, D. (2000). Transcriptional Control of the Citrate-Inducible *citMCDEFGRP* Operon, Encoding Genes Involved in Citrate Fermentation in *Leuconostoc paramesenteroides*. *J. Bacteriol.* **182**, 3904–3912.
- Martín, M.G., Sender, P.D., Peirú, S., De Mendoza, D., and Magni, C. (2004). Acid-inducible transcription of the operon encoding the citrate lyase complex of *Lactococcus lactis* biovar diacetyllactis CRL264. *J. Bacteriol.* **186**, 5649–5660.
- Martin, M.G., Magni, C., Mendoza, D.D., and Lo, P. (2005). CitI, a Transcription Factor Involved in Regulation of Citrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. *187*, 5146–5155.
- Martín, M., Corrales, M.A., de Mendoza, D., López, P., and Magni, C. (1999). Cloning and molecular characterization of the citrate utilization *citMCDEFGRP* cluster of *Leuconostoc paramesenteroides*. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**, 231–238.
- McCoy, J., J. Philip (2001). Handling, Storage, and Preparation of Human Blood Cells. In *Current Protocols in Cytometry*, (John Wiley & Sons, Inc.).
- Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.P., and Goker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* **14**, 60.
- Mokhtari, A., Blancato, V.S., Repizo, G.D., Henry, C., Pikis, A., Bourand, A., de Fatima Alvarez, M., Immel, S., Mechakra-Maza, A., Hartke, A., et al. (2013). *Enterococcus faecalis* utilizes maltose by connecting two incompatible metabolic routes via a novel maltose 6'-phosphate phosphatase (MapP). *Mol Microbiol* **88**, 234–253.
- Mortera, P., Espariz, M., Suárez, C., Repizo, G., Deutscher, J., Alarcón, S., Blancato, V., and Magni, C. (2012). Fine-tuned transcriptional regulation of malate operons in *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1936–1945.
- Mortera, P., Pudlik, A., Magni, C., Alarcón, S., and Lolkema, J.S. (2013). Ca<sup>2+</sup> -citrate uptake and metabolism in *Lactobacillus casei* atcc 334. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 4603–4612.
- Mozzi, F., Raya, R.R., and Vignolo, G.M. (2015). *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications: Second edition.*
- Mukherjee, K., Altincicek, B., Hain, T., Domann, E., Vilcinskas, A., and Chakraborty, T. (2010). *Galleria mellonella* as a model system for studying Listeria pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 310–317.
- Mukherjee, K., Mraheil, M.A., Silva, S., Müller, D., Cemic, F., Hemberger, J., Hain, T., Vilcinskas, A., and Chakraborty, T. (2011). Anti-Listeria activities of *Galleria mellonella* hemolymph proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 4237–4240.
- Mylonakis, E., Moreno, R., El, J.B., Idnurm, A., Heitman, J., Stephen, B., Ausubel, F.M., Diener, A., Houry, J.B.E., and Calderwood, S.B. (2005). *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect. Immun.* **73**, 3842–2850.
- Nallapareddy, S.R., Singh, K.V., Sillanpää, J., Zhao, M., and Murray, B.E. (2011). Relative Contributions of Ebp Pili and the Collagen Adhesin Ace to Host Extracellular Matrix Protein Adherence and Experimental Urinary Tract Infection by *Enterococcus faecalis* OG1RF. *Infect. Immun.* **79**, 2901–2910.

- Natarajan, P., and Parani, M. (2015). First complete genome sequence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain T-110 and its comparative genome analysis with pathogenic and non-pathogenic *Enterococcus faecium* genomes. *J Genet Genomics* 42, 43–46.
- Nigo, M., Munita, J.M., Arias, C.A., and Murray, B.E. (2014). What's New in the Treatment of Enterococcal Endocarditis? *Curr. Infect. Dis. Rep.* 16, 431–431.
- Nueno-Palop, C., and Narbad, A. (2011). Probiotic assessment of *Enterococcus faecalis* CP58 isolated from human gut. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 390–394.
- Ogier, J.C., and Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol* 126, 291–301.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., et al. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42, D206–D214.
- Ozen, M., and Dinleyici, E.C. (2015). The history of probiotics: the untold story. *Benef. Microbes* 6, 159–165.
- Palmer, K.L., Carniol, K., Manson, J.M., Heiman, D., Shea, T., Young, S., Zeng, Q., Gevers, D., Feldgarden, M., Birren, B., et al. (2010). High-Quality Draft Genome Sequences of 28 *Enterococcus* sp. Isolates. *J. Bacteriol.* 192, 2469–2470.
- Panesso, D., Reyes, J., Rincón, S., Díaz, L., Galloway-Peña, J., Zurita, J., Carrillo, C., Merentes, A., Guzmán, M., Adachi, J.A., et al. (2010). Molecular Epidemiology of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: a Prospective, Multicenter Study in South American Hospitals. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1562–1569.
- Pech, L.L., and Strand, M.R. (1996). Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *J. Cell Sci.* 109, 2053.
- Pereira, C.I., Matos, D., San Romão, M.V., and Barreto Crespo, M.T. (2009). Dual Role for the Tyrosine Decarboxylation Pathway in *Enterococcus faecium* E17: Response to an Acid Challenge and Generation of a Proton Motive Force. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 345–352.
- Perez, M., Ladero, V., del Rio, B., Redruello, B., de Jong, A., Kuipers, O., Kok, J., Martin, M.C., Fernandez, M., and Alvarez, M.A. (2017). The Relationship among Tyrosine Decarboxylase and Agmatine Deiminase Pathways in *Enterococcus faecalis*. *Front. Microbiol.* 8, 2107.
- Pessione, E., and Cirrincione, S. (2016). Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *Front. Microbiol.* 7, 876.
- Pos, K.M., Dimroth, P., and Bott, M. (1998). The *Escherichia coli* Citrate Carrier CitT: a Member of a Novel Eubacterial Transporter Family Related to the 2-Oxoglutarate/Malate Translocator from Spinach Chloroplasts. *J. Bacteriol.* 180, 4160–4165.
- Presti, I., D'Orazio, G., Labra, M., La Ferla, B., Mezzasalma, V., Bizzaro, G., Giardina, S., Michelotti, A., Tursi, F., Vassallo, M., et al. (2015). Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their in vitro effect. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 5613–5626.

- Qin, X., Galloway-Peña, J.R., Sillanpaa, J., Roh, J., Nallapareddy, S.R., Chowdhury, S., Bourgogne, A., Choudhury, T., Muzny, D.M., Buhay, C.J., et al. (2012). Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* strain TX16 and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecium* genomes. *BMC Microbiol.* 12, 135.
- Quintana, I.M. (2013). Identificación y caracterización bioquímica del sistema de transporte de citrato en *Enterococcus faecium*.
- Repizo, G.D., Mortera, P., and Magni, C. (2011). Disruption of the *alsSD* operon of *Enterococcus faecalis* impairs growth on pyruvate at low pH. *Microbiology* 157, 2708–2719.
- Repizo, G.D., Blancato, V.S., Mortera, P., Lolkema, J.S., and Magni, C. (2013). Biochemical and genetic characterization of the *Enterococcus faecalis* Oxaloacetate decarboxylase complex. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2882–2890.
- Repizo, G.D., Espariz, M., Blancato, V.S., Suarez, C.A., Esteban, L., and Magni, C. (2014). Genomic comparative analysis of the environmental *Enterococcus mundtii* against enterococcal representative species. *BMC Genomics* 15, 489.
- Riboulet, E., Verneuil, N., La Carbona, S., Sauvageot, N., Auffray, Y., Hartke, A., and Giard, J.-C. (2007). Relationships between oxidative stress response and virulence in *Enterococcus faecalis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13, 140–146.
- Rice, L.B., Carias, L., Rudin, S., Vael, C., Goossens, H., Konstabel, C., Klare, I., Nallapareddy, S.R., Huang, W., and Murray, B.E. (2003). A Potential Virulence Gene, *hylEfm*, Predominates in *Enterococcus faecium* of Clinical Origin. *J. Infect. Dis.* 187, 508–512.
- Rich, J.T., Neely, J.G., Paniello, R.C., Voelker, C.C., Nussenbaum, B., and Wang, E.W. (2010). A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves. *Otolaryngol Head Neck Surg* 143, 331–336.
- Richardson, R. (2013). Inflammation, suppuration, putrefaction, fermentation: Joseph Lister's microbiology. *Notes Rec. R. Soc.* 67, 211.
- Richter, M., and Rossello-Mora, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19126–19131.
- Rigottier-Gois, L., Alberti, A., Houel, A., Taly, J.F., Palcy, P., Manson, J., Pinto, D., Matos, R.C., Carrilero, L., Montero, N., et al. (2011). Large-scale screening of a targeted *Enterococcus faecalis* mutant library identifies envelope fitness factors. *PLoS ONE* 6.
- Rijnen, L., Bonneau, S., and Yvon, M. (1999). Genetic Characterization of the Major Lactococcal Aromatic Aminotransferase and Its Involvement in Conversion of Amino Acids to Aroma Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4873–4880.
- Rodionova, I.A., Li, X., Thiel, V., Stolyar, S., Stanton, K., Fredrickson, J.K., Bryant, D.A., Osterman, A.L., Best, A.A., and Rodionov, D.A. (2013). Comparative genomics and functional analysis of rhamnose catabolic pathways and regulons in bacteria. *Front. Microbiol.* 4, 407.
- Rosvoll, T.C.S., Lindstad, B.L., Lunde, T.M., Hegstad, K., Aasnaes, B., Hammerum, A.M., Lester, C.H., Simonsen, G.S., Sundsfjord, A., and Pedersen, T. (2012). Increased high-level gentamicin resistance in invasive *Enterococcus faecium* is associated with *aac(6')Ie-aph(2'')Ia*-encoding

transferable megaplasms hosted by major hospital-adapted lineages. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 66, 166–176.

Saavedra, L., Taranto, M.P., Sesma, F., and de Valdez, G.F. (2003). Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *Enterococci Foods Funct. Saf. Asp.* 88, 241–245.

Saitou, N., and Nei, M. (1987). The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* 406–425.

Salzet, M. (2001). Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol.* 22, 285–288.

Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., and Tsakalidou, E. (2001). Citrate Metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5482–5487.

Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., and Tsakalidou, E. (2002). Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *Int J Food Microbiol* 76, 93–105.

Sarantinopoulos, P., Makras, L., Vaningelgem, F., Kalantzopoulos, G., De Vuyst, L., and Tsakalidou, E. (2003). Growth and energy generation by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 during citrate metabolism. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 197–206.

Sauvageot, N., Mokhtari, A., Joyet, P., Budin-Verneuil, A., Blancato, V.S., Repizo, G.D., Henry, C., Pikis, A., Thompson, J., Magni, C., et al. (2017). *Enterococcus faecalis* Uses a Phosphotransferase System Permease and a Host Colonization-Related ABC Transporter for Maltodextrin Uptake. *J Bacteriol* 199.

Savijoki, K., Ingmer, H., and Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 71, 394–406.

Scheu, P.D., Witan, J., Rauschmeier, M., Graf, S., Liao, Y.-F., Ebert-Jung, A., Basché, T., Erker, W., and Uden, G. (2012). CitA/CitB Two-Component System Regulating Citrate Fermentation in *Escherichia coli* and Its Relation to the DcuS/DcuR System In Vivo. *J. Bacteriol.* 194, 636–645.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676.

Schleifer, K.H., and Kilpper-Bälz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 34, 31–34.

Schumacher, M.A., Allen, G.S., Diel, M., Seidel, G., Hillen, W., and Brennan, R.G. (2004). Structural Basis for Allosteric Control of the Transcription Regulator CcpA by the Phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell* 118, 731–741.

Settanni, L., and Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* 27, 691–697.



- Sicard, D., and Legras, J.-L. (2011). Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Trail Domest. Migr. Invasions Agric.* 334, 229–236.
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., and Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* 34, D32–6.
- Sillanpää, J., Nallapareddy, S.R., Singh, K.V., Prakash, V.P., Fothergill, T., Ton-That, H., and Murray, B.E. (2010). Characterization of the ebp(fm) pilus-encoding operon of *Enterococcus faecium* and its role in biofilm formation and virulence in a murine model of urinary tract infection. *Virulence* 1, 236–246.
- Sillanpää, J., Chang, C., Singh, K.V., Montealegre, M.C., Nallapareddy, S.R., Harvey, B.R., Ton-That, H., and Murray, B.E. (2013). Contribution of Individual Ebp Pilus Subunits of *Enterococcus faecalis* OG1RF to Pilus Biogenesis, Biofilm Formation and Urinary Tract Infection. *PLoS ONE* 8, e68813.
- Singh, T.K., Drake, M.A., and Cadwallader, K.R. (2003). Flavor of Cheddar Cheese: A Chemical and Sensory Perspective. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2, 166–189.
- Smit, G., Smit, B.A., and Engels, W.J.M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 591–610.
- Smith, B. (2012). Perspective: complexities of flavour. *Nature* 486, S6.
- Smith, T.L. (1938). Genetical Studies on the Wax Moth *Galleria Mellonella* Linn. *Genetics* 23, 115–137.
- Snoep, J.L., Teixeira de Mattos, M.J., Starrenburg, M.J., and Hugenholtz, J. (1992b). Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and alpha-acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*. *J. Bacteriol.* 174, 4838–4841.
- Snoep, J.L., De Graef, M.R., Teixeira De Mattos, M.J., and Neijssel, O.M. (1992a). Pyruvate catabolism during transient state conditions in chemostat cultures of *Enterococcus faecalis* NCTC 775: importance of internal pyruvate concentrations and NADH/NAD<sup>+</sup> ratios. *Microbiology* 138, 2015–2020.
- Solovyev, V., and Salamov, A. (2011). Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In *Metagenomics and Its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*, (Ed. R.W. L).
- Sousa, M., Ardö, Y., and McSweeney, P.L. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Cheese Ripening Technol.* 11, 327–345.
- Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., Coton, E., Coton, M., Barnavon, L., Bach, B., et al. (2010). Biogenic amines in fermented foods. *Eur J Clin Nutr* 64, S95–S100.
- Stiles, M.E., and Holzappel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1–29.

- Suarez, C., Repizo, G., Espariz, M., Blancato, V., Magni, C., and Alarcón, S. (2012). Detection and identification of tyrDC + enterococcal strains from pasteurized commercial cheeses. *Food Sci. Biotechnol.* *21*, 603–606.
- Suárez, C., Espariz, M., Blancato, V.S., and Magni, C. (2013). Expression of the Agmatine Deiminase Pathway in *Enterococcus faecalis* Is Activated by the AguR Regulator and Repressed by CcpA and PTS(Man) Systems. *PLoS ONE* *8*, e76170.
- Suárez, C.A., Blancato, V.S., Poncet, S., Deutscher, J., and Magni, C. (2011a). CcpA represses the expression of the divergent *cit* operons of *Enterococcus faecalis* through multiple cre sites. *BMC Microbiol.* *11*, 227.
- Suárez, C.A., Blancato, V.S., Poncet, S., Deutscher, J., and Magni, C. (2011b). CcpA represses the expression of the divergent *cit* operons of *Enterococcus faecalis* through multiple cre sites. *BMC Microbiol.* *11*, 227.
- Sun, P., Wang, J., and Jiang, Y. (2010). Effects of *Enterococcus faecium* (SF68) on immune function in mice. *Food Chem.* *123*, 63–68.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* *28*, 2731–2739.
- Tatusova, T., Ciufo, S., Fedorov, B., O'Neill, K., and Tolstoy, I. (2014). RefSeq microbial genomes database: new representation and annotation strategy. *Nucleic Acids Res.* *42*, D553–D559.
- Teixeira, L.M., Carvalho, M.G., Espinola, M.M., Steigerwalt, A.G., Douglas, M.P., Brenner, D.J., and Facklam, R.R. (2001). *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov., associated with enteric disorders in animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *51*, 1737–1743.
- Terzaghi, B.E., and Sandine, W.E. (1975). Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages. *Appl. Microbiol.* *29*, 807–813.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. (2002). Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. In *Current Protocols in Bioinformatics*, (John Wiley & Sons, Inc.), p.
- Tojo, S., Naganuma, F., Arakawa, K., and Yokoo, S. (2000). Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* *46*, 1129–1135.
- Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penadés, J.R., and Lasa, I. (2001). The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 4538–4545.
- Top, J., Willems, R., van der Velden, S., Asbroek, M., and Bonten, M. (2008). Emergence of Clonal Complex 17 *Enterococcus faecium* in The Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* *46*, 214–219.
- Tsai, C.-C., Lin, P.-P., Hsieh, Y.-M., Zhang, Z., Wu, H.-C., and Huang, C.-C. (2014). Cholesterol-Lowering Potentials of Lactic Acid Bacteria Based on Bile-Salt Hydrolase Activity and Effect of Potent Strains on Cholesterol Metabolism In Vitro and In Vivo. *Sci. World J.* *2014*, 690752.
- Urretabizkaya, N., Vasicek, A., and Saini, E. (2010). Lepidópteros. Insectos perjudiciales de importancia agronómica. (Buenos Aires: Ediciones INTA).



- Vancanneyt, M., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Baele, M., Descheemaeker, P., Goossens, H., Pot, B., Vandamme, P., Swings, J., Haesebrouck, F., et al. (2001). *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 393–400.
- Vanangelgem, F., Ghijssels, V., Tsakalidou, E., and Vuyst, L.D. (2006). Cometabolism of Citrate and Glucose by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in the Absence of Cellular Growth. *Society* **72**, 319–326.
- Vankerckhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., and Goossens, H. (2004). Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4473–4479.
- Vebø, H.C., Snipen, L., Nes, I.F., and Brede, D.A. (2009). The Transcriptome of the Nosocomial Pathogen *Enterococcus faecalis* V583 Reveals Adaptive Responses to Growth in Blood. *PLoS ONE* **4**, e7660.
- Vebø, H.C., Solheim, M., Snipen, L., Nes, I.F., and Brede, D.A. (2010). Comparative Genomic Analysis of Pathogenic and Probiotic *Enterococcus faecalis* Isolates, and Their Transcriptional Responses to Growth in Human Urine. *PLoS ONE* **5**, e12489.
- Vogel, S.N. (2012). How Discovery of Toll-Mediated Innate Immunity in *Drosophila* Impacted Our Understanding of TLR Signaling (and Vice Versa). *J. Immunol.* **188**, 5207.
- Vos, P., van Asseldonk, M., van Jeveren, F., Siezen, R., Simons, G., and de Vos, W.M. (1989). A maturation protein is essential for production of active forms of *Lactococcus lactis* SK11 serine proteinase located in or secreted from the cell envelope. *J. Bacteriol.* **171**, 2795–2802.
- Walser, M. (1961). ION ASSOCIATION. VI. Interactions between calcium, magnesium, inorganic phosphate, citrate and protein in normal human plasma. *J. Clin. Invest.* **40**, 723–730.
- Warner, J.B., Magni, C., and Lolkema, J.S. (2003). CcpA-Independent Regulation of Expression of the Mg(2+)-Citrate Transporter Gene *citM* by Arginine Metabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **185**, 854–859.
- Weimer, B., Seefeldt, K., and Dias, B. (1999). Sulfur metabolism in bacteria associated with cheese. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 247–261.
- Wells, C.L., Jechorek, R.P., and Erlandsen, S.L. (1990). Evidence for the Translocation of *Enterococcus faecalis* across the Mouse Intestinal Tract. *J. Infect. Dis.* **162**, 82–90.
- Willems, R.J.L., Top, J., van Schaik, W., Leavis, H., Bonten, M., Sirén, J., Hanage, W.P., and Corander, J. (2012). Restricted Gene Flow among Hospital Subpopulations of *Enterococcus faecium*. *MBio* **3**, e00151-12.
- Wojda, I. (2016). Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci.*
- Wyatt, G.R. (1961). The Biochemistry of Insect Hemolymph. *Annu. Rev. Entomol.* **6**, 75–102.
- Yamamoto, H., Murata, M., and Sekiguchi, J. (2000). The CitST two-component system regulates the expression of the Mg-citrate transporter in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **37**, 898–912.

- Yoon, S.S., and Mekalanos, J.J. (2006). 2,3-Butanediol Synthesis and the Emergence of the *Vibrio cholerae* El Tor Biotype. *Infect. Immun.* 74, 6547–6556.
- Yuen, G.J., and Ausubel, F.M. (2014). *Enterococcus* infection biology: Lessons from invertebrate host models. *J. Microbiol.* 52, 200–210.
- Yvon, M., and Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Cheese Ripening Technol.* 11, 185–201.
- Zeng, J., Teng, F., Weinstock, G.M., and Murray, B.E. (2004). Translocation of *Enterococcus faecalis* Strains across a Monolayer of Polarized Human Enterocyte-Like T84 Cells. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1149–1154.
- Zuljan, F.A., Repizo, G.D., Alarcon, S.H., and Magni, C. (2014). Alpha-Acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* contributes to pH homeostasis in acid stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 188, 99–107.